

# Kernweite H2AX-Phosphorylierung nach Schwerionenbestrahlung

Vom Fachbereich Biologie der Technischen Universität Darmstadt

zur

Erlangung des akademischen Grades

eines Doctor rerum naturalium

genehmigte Dissertation von

Dipl.-Biol. Barbara Meyer

aus Nürnberg

Berichterstatter (1. Referent): Prof. Dr. Marco Durante

Mitberichterstatter (2. Referent): Prof. Dr. Markus Löbrich

Tag der Einreichung: 21. Dezember 2011

Tag der mündlichen Prüfung: 27. März 2012

Darmstadt 2012

D 17



# Inhaltsverzeichnis

<b>Abbildungsverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b>	<b>7</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>8</b>
<b>1 Zusammenfassung/Summary</b>	<b>11</b>
<b>2 Einleitung</b>	<b>15</b>
2.1 Physikalische Grundlagen ionisierender Strahlung . . . . .	15
2.2 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung . . . . .	19
2.2.1 Induktion von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung . . . . .	19
2.2.2 Reaktion der Zelle auf die Induktion von DNA-Schäden . . . . .	21
2.2.3 Überblick über die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden . . . . .	22
2.3 Rolle des Chromatins in der Reparatur von DNA-Schäden . . . . .	24
2.3.1 Dynamischer Aufbau des Chromatins . . . . .	24
2.3.2 Die Bedeutung von H2AX und seinen Modifikationen in der DNA-Reparatur . .	26
2.4 Aktivierung von Kinasen der PIKK-Familie durch DNA-Schäden . . . . .	28
2.4.1 ATM ( <i>Ataxia telangiectasia mutated</i> ) . . . . .	29
2.4.2 ATR ( <i>ATM and Rad3-related</i> ) . . . . .	29
2.4.3 DNA-PK ( <i>DNA-dependent protein kinase</i> ) . . . . .	30
2.5 Mechanismus der H2AX-Phosphorylierung durch ATM, ATR und DNA-PK . . . . .	31
2.6 Zielsetzung . . . . .	32
<b>3 Methoden und Materialien</b>	<b>34</b>
3.1 Methoden . . . . .	34
3.1.1 Zellkultur . . . . .	34
3.1.2 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren . . . . .	34
3.1.3 Transfektion mit siRNA . . . . .	35
3.1.3.1 Transfektion von Tumorzellen . . . . .	35
3.1.3.2 Transfektion von Fibroblasten . . . . .	36
3.1.4 Bestrahlung . . . . .	36
3.1.4.1 Röntgenbestrahlung . . . . .	36
3.1.4.2 Ungerichtete Schwerionenbestrahlung am UNILAC . . . . .	36
3.1.4.3 Gezielte Schwerionenbestrahlung am UNILAC mit der Mikrosonde . .	37
3.1.4.4 Verwendete Ionen . . . . .	39
3.1.5 Bestimmung des klonogenen Überlebens von Zellen . . . . .	40
3.1.6 Immuncytochemische Methoden . . . . .	40
3.1.6.1 Paraformaldehyd-Fixierung . . . . .	40
3.1.6.2 Fixierung mit Extraktion löslicher Proteine . . . . .	40
3.1.6.3 Immunfluoreszenzfärbung . . . . .	41
3.1.6.4 Annexin-Färbung . . . . .	41
3.1.7 Konfokale Mikroskopie . . . . .	41
3.1.8 Intensitätsmessung kernweiter Fluoreszenzsignale . . . . .	42
3.1.9 Bildbearbeitung mit ImageJ . . . . .	43
3.1.10 Normierung der gemessenen Dosis-Effekt-Kurven mittels Kurvenfit . . . . .	44
3.1.11 Statistische Berechnungen . . . . .	44
3.1.12 Biochemische Methoden . . . . .	45
3.1.12.1 Präparation von Gesamtzelllysaten . . . . .	45
3.1.12.2 Subzelluläre Proteinfractionierung . . . . .	45
3.1.12.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen . . . . .	46

3.1.12.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot . . . . .	46
3.1.12.5	Immunologischer Nachweis der Proteine . . . . .	47
3.1.12.6	Strippen der Membran für erneute Immundetektion . . . . .	47
3.2	Materialien . . . . .	47
3.2.1	Zelllinien . . . . .	47
3.2.2	Zellkulturmedien und -zusätze . . . . .	50
3.2.3	siRNA . . . . .	50
3.2.4	Antikörper . . . . .	50
3.2.5	Puffer und Lösungen . . . . .	52
3.2.6	Chemikalien, Materialien und Geräte . . . . .	54
3.2.7	Software . . . . .	58
<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>59</b>
4.1	Charakterisierung des pan-nukleären $\gamma$ H2AX-Signals . . . . .	59
4.1.1	Kernweite Phosphorylierung von H2AX nach Ionenbestrahlung . . . . .	59
4.1.2	Spezifität des $\gamma$ H2AX-Signals . . . . .	61
4.1.3	Chromatingebundenheit von $\gamma$ H2AX nach Ionenbestrahlung . . . . .	62
4.1.4	Überprüfung eines Zusammenhangs der Induktion von pan-nukleärem $\gamma$ H2AX und Apoptose nach Ionenbestrahlung . . . . .	63
4.1.5	Quantifizierung des pan-nukleären $\gamma$ H2AX-Signals . . . . .	64
4.1.6	Entstehung von $\gamma$ H2AX nach gezielter Bestrahlung der Zellkerne oder des Cytoplasmas . . . . .	70
4.1.7	Zellzyklusabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung . . . . .	71
4.2	Einfluss von Dosis und Dosisverteilung auf die kernweite Phosphorylierung von H2AX . . . . .	72
4.2.1	Dosisabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung . . . . .	72
4.2.2	Einfluss der Dosisverteilung auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung . . . . .	76
4.3	Zeitabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung . . . . .	77
4.4	Kinaseabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung . . . . .	81
4.4.1	Untersuchung des pan-nukleären $\gamma$ H2AX-Signals nach Inhibition von DNA-PK und ATM . . . . .	81
4.4.2	Das pan-nukleäre $\gamma$ H2AX-Signal nach Herunterregulierung von ATM und DNA-PK . . . . .	85
4.4.3	Lokalisation von aktiviertem ATM und DNA-PK nach Ionenbestrahlung . . . . .	86
4.4.4	Aktivierung von ATM und DNA-PK in Abhängigkeit von der Schadensqualität und Schadensquantität . . . . .	86
4.4.5	Einfluss von ATR auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung . . . . .	88
4.4.6	Rolle von ATM, DNA-PK und ATR bei der Entstehung der $\gamma$ H2AX-Foci . . . . .	90
4.5	Untersuchung des Einflusses von Chromatinstrukturveränderung auf die kernweite Phosphorylierung von H2AX . . . . .	91
4.6	Untersuchung der Rolle von Resektion bei der Entstehung des kernweiten $\gamma$ H2AX-Signals . . . . .	94
4.6.1	Einfluss von CtIP auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung . . . . .	94
4.6.2	Einfluss von Mre11 auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung . . . . .	95
4.7	Kernweite Signale anderer Zielproteine von ATM und DNA-PK . . . . .	97
4.8	Bedeutung von pan-nukleärem $\gamma$ H2AX für die Rekrutierung anderer Reparaturproteine . . . . .	98
4.8.1	Bildung von 53BP1- und MDC1-Foci nach sequentieller Bestrahlung mit Ionen . . . . .	98
4.8.2	Bildung von 53BP1- und MDC1-Foci nach sequentieller Bestrahlung mit Röntgen und Ionen . . . . .	100
4.8.3	Vergleich des MDC1-Signals nach Ionenbestrahlung mit und ohne Inhibition der kernweiten H2AX-Phosphorylierung . . . . .	102
4.8.4	Untersuchung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung in MDC1-/- Zellen . . . . .	104

---

<b>5</b>	<b>Diskussion</b>	<b>106</b>
5.1	Entstehung von $\gamma$ H2AX im unbeschädigten Bereich des Chromatins nach Schwerionenstrahlung . . . . .	106
5.2	Die Regulierung der pan-nukleären H2AX-Phosphorylierung . . . . .	107
5.2.1	Dosisabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung . . . . .	107
5.2.2	Zeitlicher Verlauf der kernweiten Antwort . . . . .	110
5.2.3	Kinaseabhängigkeit der kernweiten Antwort . . . . .	113
5.2.4	Zellzyklusabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung . . . . .	117
5.2.5	Abhängigkeit der kernweiten Antwort vom LET . . . . .	118
5.3	Folgen der kernweiten Antwort für andere Reparaturproteine . . . . .	119
5.3.1	Kernweite Phosphorylierung weiterer Reparaturproteine . . . . .	119
5.3.2	Einfluss von pan-nukleärem $\gamma$ H2AX auf die MDC1- und 53BP1-Bindung . . .	120
5.4	Mögliche Auslöser für die kernweite Phosphorylierung von H2AX . . . . .	123
5.4.1	Apoptose und Seneszenz als Auslöser für die kernweite H2AX-Phosphorylierung	123
5.4.2	Mögliche Induktion der kernweiten Antwort durch Chromatinstrukturveränderung	124
5.4.3	DNA-Enden und DNA-Fragmente als Auslöser der kernweiten Antwort . . . .	125
5.5	Modell für die pan-nukleäre H2AX-Phosphorylierung . . . . .	128
5.6	Ausblick . . . . .	129
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>131</b>
<b>7</b>	<b>Anhang</b>	<b>144</b>
7.1	Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge . . . . .	144
7.2	Lebenslauf . . . . .	145
7.3	Danksagung . . . . .	146
7.4	Ehrenwörtliche Erklärung . . . . .	147

**Abbildungsverzeichnis**

1	Interaktion von Photonen mit Materie . . . . .	16
2	Flächendosisprofil für Röntgenstrahlen und Kohlenstoffionen unterschiedlicher Energie	17
3	Radiales Dosisprofil von Kohlenstoffionen unterschiedlicher Energie . . . . .	17
4	Tiefendosisprofil von Photonen und Ionen unterschiedlicher Energie . . . . .	18
5	Relative biologische Wirksamkeit von Kohlenstoff- und Röntgenstrahlen . . . . .	20
6	Struktur des Chromatins . . . . .	25
7	Aufbau der einzelnen Histone und Anordnung im Nukleosom . . . . .	27
8	H2AX-Phosphorylierung durch ATM und ATR . . . . .	31
9	Magazin und Probenhalter für die ungerichtete Bestrahlung am UNILAC . . . . .	37
10	Aufbau der Mikrosondenkammern . . . . .	38
11	Darstellung gesättigter Intensitäten und automatische Zellkernerkennung . . . . .	42
12	Das pan-nukleäre $\gamma$ H2AX-Signal nach Ionenbestrahlung . . . . .	60
13	Überprüfung der Spezifität des pan-nukleären $\gamma$ H2AX-Signals nach Ionenbestrahlung in H2AX-defizienten Zellen und mit dem polyklonalen anti- $\gamma$ H2AX-Antikörper aus Ka- ninchen . . . . .	61
14	Überprüfung der Chromatingebundenheit von $\gamma$ H2AX nach Bestrahlung mit Goldionen	63
15	Nachweis von Apoptose in humanen Fibroblasten nach Goldionen- und in Lympho- cyten nach Röntgenbestrahlung . . . . .	64
16	Zellkernerkennung und Detektion des $\gamma$ H2AX-Signals in einem Bestrahlungsfeld bei Mikrosondenbestrahlung . . . . .	65
17	Quantifizierung des kernweiten $\gamma$ H2AX-Signals . . . . .	67
18	Abschätzung der Variabilität des $\gamma$ H2AX-Signals zwischen einzelnen gleich behan- delten Proben . . . . .	69
19	Untersuchung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung nach Bestrahlung des Cyto- plasmas und der Zellkerne . . . . .	70
20	Zellzyklusabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung	72
21	Änderung der $\gamma$ H2AX-Intensität nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoffion . . . . .	73
22	Zunahme des kernweiten $\gamma$ H2AX-Signals nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen	74
23	Das pan-nukleäre $\gamma$ H2AX-Signal nach Bestrahlung mit steigenden Anzahlen Kohlenstoff- bzw. Goldionen . . . . .	75
24	Untersuchung der pan-nukleären H2AX-Phosphorylierung nach unterschiedlicher Do- sisverteilung . . . . .	77
25	Vergleich der Kinetik des kernweiten $\gamma$ H2AX-Signals nach Bestrahlung mit Kohlenstoff- Stickstoff- und Goldionen und Vergleich mit der Kinetik der $\gamma$ H2AX-Foci . . . . .	79
26	Vergleich des $\gamma$ H2AX-Signals an der Ionenspur zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Kohlenstoff- und Goldionen . . . . .	80
27	Untersuchung der H2AX-Phosphorylierung nach Xenonbestrahlung bei Inkubation mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen . . . . .	81
28	Überprüfung der Wirkung der PIKK-Inhibitoren mittels Western Blot nach Ionenbe- strahlung . . . . .	82
29	Überprüfung der Zytotoxizität der kurzzeitigen Behandlung mit ATM- und DNA-PK- Inhibitor . . . . .	83
30	Einfluss von ATM- und DNA-PK-Inhibition auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung . . . . .	84
31	Untersuchung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung in ATM- und DNA-PK-defizienten Zelllinien . . . . .	85
32	Untersuchung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung nach Unterdrückung der Ex- pression von ATM und DNA-PK . . . . .	86

33	Lokalisation von pATM (S1981) und pDNA-PKcs (S2056) im Zellkern nach Ionenbestrahlung . . . . .	87
34	Quantifizierung von pDNA-PKcs (S2056) und pATM (S1981) nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen und unterschiedlicher Bestrahlungsqualität . . . . .	88
35	Einfluss von ATR auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung .	89
36	Einfluss von ATM, DNA-PK und ATR auf die Bildung der $\gamma$ H2AX-Foci nach Ionenbestrahlung . . . . .	91
37	Einfluss von Acetylierung auf pan-nukleäres $\gamma$ H2AX . . . . .	93
38	Quantifizierung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung nach Herunterregulierung von CtIP . . . . .	95
39	Intensität des kernweiten $\gamma$ H2AX-Signals nach Herunterregulierung von CtIP und Mre11	96
40	Überprüfung der Mengen an CtIP und Mre11 mittels Western Blot Analyse nach Unterdrückung der Proteinexpression . . . . .	96
41	Lokalisation von pRPA (S4/S8) und pNBS1 (S343) im Zellkern nach Ionenbestrahlung	97
42	Untersuchung des 53BP1-Signals nach sequentieller Bestrahlung mit Goldionen . . .	99
43	Untersuchung des MDC1-Signals nach sequentieller Bestrahlung mit Goldionen . . .	100
44	Untersuchung der 53BP1- und MDC1-Signale nach sequentieller Bestrahlung mit Ionen und Röntgenstrahlen . . . . .	101
45	Das 53BP1- und MDC1-Signal nach sequentieller Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Ionen . . . . .	102
46	Untersuchung des MDC1-Signals nach Ionenbestrahlung bei Unterdrückung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung durch ATM- und DNA-PK-Inhibition . . . . .	103
47	Einfluss von MDC1 auf die H2AX-Phosphorylierung und die ATM- bzw. DNA-PK-Abhängigkeit der H2AX-Phosphorylierung . . . . .	105
48	Kinase-Abhängigkeit von pan-nukleärem $\gamma$ H2AX nach Behandlung mit hypotoner Lösung . . . . .	116
49	Einfluss von Acetylierung auf die Anzahl detektierter $\gamma$ H2AX-Foci . . . . .	124

## Tabellenverzeichnis

1	Energien und LETs der verwendeten Ionen . . . . .	39
2	Verwendete siRNAs . . . . .	50
3	Primärantikörper . . . . .	51
4	Sekundärantikörper . . . . .	52

## Abkürzungsverzeichnis

53BP1	p53 Bindeprotein 1
A	Ampere
Abb.	Abbildung
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzolsulfonylfluorid
APS	Ammoniumpersulfat
ATM	<i>Ataxia telangiectasia mutated</i>
ATMi	ATM-Inhibitor
ATMsi	gegen ATM gerichtete siRNA
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
ATR	<i>ATM and Rad3-related</i>
ATRsi	gegen ATR gerichtete siRNA
BER	Basenexzisionsreparatur
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
c	centi
ca.	circa
CDK	<i>cyclin dependent kinase</i>
CENP-F	Centromer-Protein F
Chk1	<i>Checkpoint kinase 1</i>
Chk2	<i>Checkpoint kinase 2</i>
CPD	<i>cumulative population doublings</i>
CtIP	<i>CtBP interacting protein</i>
CtIPsi	gegen CtIP gerichtete siRNA
ctrl siRNA	unspezifische Kontroll-siRNA
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's minimal essential medium</i>
DMPC	Dimethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
DNA-PK	DNA-abhängige Proteinkinase
DNA-PKcs	katalytische Untereinheit der DNA-PK ( <i>DNA-PK catalytic subunit</i> )
DNA-PKi	DNA-PK-Inhibitor
DNA-PKsi	gegen DNA-PK gerichtete siRNA
DSB	Doppelstrangbruch
DTT	Dithiothreitol
EBSS	<i>Earle's balanced salt solution</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
EMEM	<i>Eagle's minimal essential medium</i>
ESB	Einzelstrangbruch
eV	Elektronenvolt
FCS	<i>fetal calf serum</i>



FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
$\gamma$	gamma
g	Erdbeschleunigung, Gramm
Gy	Gray
h	Stunde
HR	Homologe Rekombination
HRP	<i>horse radish peroxidase</i>
hTert	humane Telomerase Reverse Transkriptase
IF	Immunfluoreszenz
JNK	c-Jun N-terminale Kinase
IR	ionisierende Strahlung ( <i>ionizing radiation</i> )
k	kilo
kb	Kilobasenpaare
l	Liter
LDS	Lithiumdodecylsulfat
LEM	Local-Effect-Modell
LET	linearer Energietransfer
$\mu$	Mikro
M	Molar, Mega
m	milli, Meter
Mbp	Megabasenpaare
MDC1	<i>mediator of DNA-damage checkpoint 1</i>
MEF	<i>mouse embryonic fibroblasts</i>
min	Minute
MNase	<i>micrococcal nuclease</i>
Mre11	<i>meiotic recombination protein 11</i>
Mre11si	gegen Mre11 gerichtete siRNA
MRN-Komplex	Mre11-Rad50-NBS1-Komplex
n	nano
NBS1	<i>Nijmegen breakage syndrom 1</i>
NER	Nukleotidexzisionsreparatur
NHEJ	Nicht-homologe End-zu-End-Verknüpfung
P	Passage
p	phosphoryliert
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinasen
PIKK	<i>phosphatidylinositol 3-kinase related protein kinases</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RBW	relative biologische Wirksamkeit
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	<i>reactive oxygen species</i>
RPA	<i>replication protein A</i>

RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
S	Serin
SDS	<i>sodium dodecylsulfat</i>
sec	Sekunde
siRNA	<i>small interfering ribonucleic acid</i>
SMC1	<i>Structural maintenance of chromosomes 1</i>
T	Threonin
T/cm <sup>2</sup>	Teilchen/cm <sup>2</sup>
TBS	<i>tris buffered saline</i>
TEMED	Tetramethyldiamin
TRAIL	<i>tumor necrosis factor-related apoptosis-induced ligand</i>
TSA	Trichostatin A
TUNEL	<i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i>
U	unit
UNILAC	<i>Universal Linear Accelerator</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
V(D)J	<i>variable (diversity) joining</i>
v/v	Volumenprozent
w/v	Gewicht/Volumen ( <i>weight/volume</i> )
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
XPA	<i>xeroderma pigmentosum complementation group protein A</i>

## 1 Zusammenfassung/Summary

Schwerionenstrahlen verursachen in der Zelle in Abhängigkeit von ihrer Energie lokalisierte, komplexe DNA-Schäden, die eine besondere Herausforderung für die Reparaturmechanismen der Zelle darstellen. Das Histon H2AX fördert die Reparatur von DNA-Schäden durch Akkumulation von Reparaturfaktoren in der Nähe der DNA-Schäden. Hierzu wird H2AX im Megabasenpaarbereich um DNA-Doppelstrangbrüche an Serin 139 phosphoryliert, wodurch  $\gamma$ H2AX gebildet wird.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nach Induktion komplexer DNA-Schäden durch Schwerionenbestrahlung zusätzlich ein spezifisches, jedoch schwächeres  $\gamma$ H2AX-Signal über den gesamten Zellkern verteilt entsteht. Dieser Prozess ist in humanen und murinen Zellen, sowie in Hamsterzellen konserviert und findet sowohl in normalen Fibroblasten als auch in Tumorzellen statt. Bei pan-nukleärem  $\gamma$ H2AX handelt es sich nicht um aus dem Chromatin ausgetauschtes Histon, sondern H2AX wird auch im nicht beschädigten Bereich phosphoryliert, wobei dieser Prozess sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase stattfindet. Ein möglicher Zusammenhang mit Apoptose, bei der ebenfalls eine kernweite H2AX-Phosphorylierung induziert wird, konnte durch zellmorphologische Untersuchungen, sowie Analyse mit Apoptosemarkern ausgeschlossen werden. Zur genaueren Charakterisierung der kernweiten Antwort wurde  $\gamma$ H2AX mittels Immunfluoreszenzmikroskopie quantifiziert, wodurch eine Unterscheidung zwischen dem  $\gamma$ H2AX-Signal an den DNA-Schäden und dem kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signal möglich war und die Signale der  $\gamma$ H2AX-Foci zu einem großen Teil aus der Messung ausgeschlossen werden konnten. Dabei wurde die genaue Bestrahlung durch die Mikrosonde angewendet, die eine gezielte Lokalisierung einer definierten Anzahl an Ionen innerhalb des Zellkerns ermöglicht. Durch diese Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die kernweite Antwort nur nach Bestrahlung der Zellkerne, nicht aber des Cytoplasmas ausgelöst wird. Desweiteren nimmt die kernweite H2AX-Phosphorylierung eindeutig mit steigender Dosis zu, wobei  $\gamma$ H2AX bei höheren Dosen langsamer ansteigt. Schon nach Bestrahlung mit einzelnen Kohlenstoffionen (ca. 0,2 Gy) wird diese Antwort induziert und ist bis zu einer Dosis von ca. 70 Gy nach Bestrahlung mit mehreren Goldionen nicht gesättigt, so dass  $\gamma$ H2AX an den Foci immer noch stärker war als im unbeschädigten Bereich des Zellkerns. Es ist also keine Schwellendosis nötig, um diese Antwort auszulösen, so dass es möglich erscheint, dass dieser Prozess auch bei locker ionisierender Bestrahlung in geringem Umfang stattfinden könnte. Die Verteilung der Ionentreffer innerhalb des Zellkerns hatte keinen Einfluss auf die H2AX-Phosphorylierung. Die Untersuchung der kernweiten Antwort über die Zeit ergab, dass bereits eine Stunde nach Bestrahlung eine Rückbildung von kernweisem  $\gamma$ H2AX beginnt und  $\gamma$ H2AX wenige Stunden nach Bestrahlung auf einem niedrigen Niveau verbleibt. Interessanterweise ist die Rückbildung des pan-nukleären Signals unabhängig vom verwendeten Ion und der applizierten Dosis, während die Rückbildung der  $\gamma$ H2AX-Foci eine langsamere Kinetik insbesondere nach höherem LET aufweist, da DNA-Schäden mit zunehmender Komplexität eine längere Reparaturzeit benötigen. Dies deutet darauf hin, dass die Reparatur von DNA-Doppelstrangbrüchen keine Voraussetzung für die Rückbildung von pan-nukleärem  $\gamma$ H2AX ist. Es wurde eindeutig unter Verwendung von spezifischen Inhibitoren und defizienten Zellen gezeigt, dass die kernweite H2AX-Phosphorylierung von ATM und DNA-PK katalysiert wird, da die kernweite H2AX-Phosphorylierung erst durch Unterdrückung beider Kinasen vollständig inhibiert wurde. Bei Aktivität nur einer der beiden Kinasen wird die kernweite Antwort induziert, ist jedoch meist abgeschwächt. Der Verlust einer Kinase kann also nicht vollständig durch die andere Kinase kompensiert

werden. ATM scheint bei einer Dosis von unter 10 Gy bereits vollständig aktiviert zu sein, während sich für DNA-PK abzeichnete, dass die Menge der aktivierten Kinase LET-abhängig ist und auch bei hohen Dosen bis 50 Gy noch weiter ansteigen kann. Dies könnte dazu führen, dass DNA-PK bei höheren Dosen eine immer stärkere Rolle im Vergleich zu ATM einnimmt.

Es sind verschiedene Mechanismen vorstellbar, wie die kernweite H2AX-Phosphorylierung ausgelöst werden könnte. Es wird beschrieben, dass durch Bestrahlung Chromatinstrukturveränderungen über Acetylierung von Histonen induziert werden. Nach Schwerionenbestrahlung könnte eine globale acetylierungsabhängige Veränderung der Chromatinstruktur eine kernweite Kinase-Aktivierung bewirken. Daher wurde der Einfluss der Inhibition von Histondeacetylasen oder Acetyltransferasen auf die kernweite Antwort untersucht. Acetylierung war jedoch nicht nötig, um die kernweite Antwort zu induzieren und Hyperacetylierung löste die kernweite Antwort nicht aus, verstärkte diese jedoch nach Schwerionenbestrahlung, was mit einer verbesserten Zugänglichkeit von H2AX in Zusammenhang stehen könnte. Eine pan-nukleäre H2AX-Phosphorylierung kann auch beim Einbringen von DNA-Fragmenten in die Zelle ausgelöst werden, wodurch vor allem DNA-PK aktiviert wird. Nach Schwerionenbestrahlung entstehen DNA-Brüche in enger räumlicher Nähe zueinander, so dass DNA-Fragmente direkt oder auch durch Nuklease-Aktivität gefördert entstehen könnten. Um einen möglichen Einfluss von Nukleasen auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung zu überprüfen, wurde die Expression von CtIP und Mre11 herunterreguliert. Beide Nukleasen scheinen jedoch nicht zu einer Verstärkung der kernweiten Antwort beizutragen, stattdessen scheint Mre11 die kernweite Antwort eher zu verringern. Dabei ist jedoch noch unklar, über welchen Mechanismus Mre11 diesen Effekt bewirken könnte. Desweiteren wäre es möglich, dass ATM und DNA-PK am DNA-Schaden aktiviert werden und von dort in aktiver Form für kurze Zeit durch den Zellkern diffundieren können. Allerdings ist eine Diffusion von DNA-PK in aktiver Form vom DNA-Ende weg bisher nicht beschrieben. Die genaue Ursache für die kernweite Antwort bleibt daher zunächst offen.

Da  $\gamma$ H2AX an DNA-Doppelstrangbrüchen die Akkumulation von Reparaturfaktoren fördert, wurde ein möglicher Einfluss von kernweisem  $\gamma$ H2AX auf andere Reparaturkomponenten untersucht. Wie in der Nähe des DNA-Schadens besteht kernweit eine gegenseitige Abhängigkeit von  $\gamma$ H2AX und MDC1, einem Mediatorprotein, das an DNA-Doppelstrangbrüchen die verstärkte Akkumulation von ATM und die Rekrutierung von 53BP1 vermittelt. Es wurde gezeigt, dass MDC1 an pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX bindet und dabei die Phosphorylierung von weiterem H2AX durch ATM und DNA-PK verstärkt. Die MDC1-Bindung am DNA-Schaden scheint dabei deutlich vermindert zu sein. 53BP1 hingegen bindet fest in der Nähe des DNA-Schadens, es konnte jedoch keine kernweite Bindung nachgewiesen werden, was darauf schließen lässt, dass pan-nukleär weitere für die 53BP1-Bindung nötige Signale fehlen. Die phosphorylierten Formen anderer Zielproteine von ATM und DNA-PK wie NBS1 und RPA zeigten kein starkes kernweites Signal. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die kernweite H2AX-Phosphorylierung die meisten Reparaturkomponenten und in diesem Zusammenhang wahrscheinlich die biologische Wirksamkeit von Schwerionenstrahlen nicht stark beeinflusst. Die Untersuchungen in dieser Arbeit liefern neue Einblicke in die Auswirkungen von Schwerionenbestrahlung auf molekularer Ebene und beschreiben eine neuartige kernweite Reaktion der Zelle auf die Induktion lokaler komplexer DNA-Schäden. Weitere Untersuchungen sind jedoch nötig, um diese Antwort vollständig zu verstehen.

Heavy ion radiation generates, dependent on its energy localized complex DNA lesions that are particularly challenging for the cellular DNA repair mechanisms. The histone H2AX promotes the repair of DNA damage through the accumulation of repair factors at the sites of DNA damage. For this purpose H2AX is phosphorylated on serine 139 in a megabasepair region around the double strand break, forming  $\gamma$ H2AX.

In this thesis it is demonstrated that after induction of complex DNA damage by heavy ion irradiation additionally a specific, although weaker  $\gamma$ H2AX signal forms throughout the whole cell nucleus. This process is conserved in human, murine and hamster cells and occurs in normal fibroblasts as well as in tumor cells. The pan-nuclear  $\gamma$ H2AX does not arise by an exchange from chromatin; H2AX is phosphorylated also in the undamaged area of the chromatin in both G1 and G2 phase of the cell cycle. A possible connection to apoptosis, that also leads to a nuclear-wide phosphorylation of H2AX, could be excluded by morphological analysis of cells and labeling with apoptotic markers. To characterize the pan-nuclear response in detail,  $\gamma$ H2AX was quantified by immunofluorescence microscopy which allows to discriminate between the pan-nuclear signal and  $\gamma$ H2AX accumulated at DNA damage sites forming foci that could largely be excluded from the evaluation. Precise irradiation with the heavy ion microbeam was used to allow the aimed targeting of cell nuclei with a defined number of ions. The analysis showed that the nuclear-wide response is only induced after irradiation of the cell nucleus, but not after irradiation of the cytoplasm. Furthermore the nuclear-wide phosphorylation of H2AX increases clearly with dose but more slowly at higher doses. This response is initiated already after irradiation with single carbon ions (ca. 0,2 Gy) and does not reach saturation up to around 70 Gy following irradiation with multiple gold ions. Even here  $\gamma$ H2AX was still stronger at the foci than in the undamaged area of the nucleus. There seems to be no threshold dose to induce this response, such that this process might also occur at a low level after sparsely ionizing radiation. The distribution of the ion hits within the cell nucleus had no influence on the H2AX phosphorylation. Analysis of the nuclear-wide response over time demonstrated that a decrease of nuclear-wide  $\gamma$ H2AX starts already one hour after irradiation and only a low level of  $\gamma$ H2AX remains a few hours after irradiation. Interestingly, the decrease of the pan-nuclear signal is independent of the ion used and the applied dose, whereas the decrease of  $\gamma$ H2AX foci follows a slower kinetics especially after the induction of DNA damage with increasing complexity that needs more time to be repaired. This suggests that the repair of DNA double strand breaks is not a prerequisite for the decrease of pan-nuclear  $\gamma$ H2AX. Using specific inhibitors and deficient cell lines it could be shown clearly that the nuclear-wide phosphorylation of H2AX is catalyzed by ATM and DNA-PK, as the pan-nuclear response could only be suppressed completely by inhibition of both kinases. With only one kinase active the nuclear-wide response was still induced but mostly weaker. Thus the kinases could not compensate each other to full extent. ATM seems to be completely activated already at a dose of under 10 Gy whereas a LET dependency was apparent for the amount of activated DNA-PK that could be further increased up to 50 Gy. This could lead to a predominant role of DNA-PK at higher doses.

The nuclear-wide phosphorylation of H2AX could be initiated by different mechanisms. It has been described that irradiation may induce changes of chromatin structure by acetylation of histones. After heavy ion irradiation a potential global acetylation-dependent change of chromatin structure could provoke the nuclear-wide kinase activity. Therefore the influence of the inhibition of histone deace-

tylases and acetyltransferases on the nuclear-wide response was analysed. However, acetylation was not necessary to induce the pan-nuclear signal and also hyperacetylation did not initiate the nuclear-wide response, but rather increased it after heavy ion irradiation. This might be connected to an improved accessibility of H2AX. A pan-nuclear H2AX phosphorylation can also be initiated by introducing DNA fragments into cells, which leads primarily to DNA-PK activation. After heavy ion irradiation DNA breaks are produced in close proximity to each other which could lead to the production of DNA fragments either directly or promoted by nuclease-dependent DNA processing. To analyse a possible influence of nucleases on the pan-nuclear H2AX phosphorylation the expression of CtIP and Mre11 was suppressed. None of the nucleases seemed to be necessary for the induction of the nuclear-wide response, instead the pan-nuclear signal appeared to be higher in the absence of Mre11, although the mechanism is not yet clear. Alternatively, it would be possible that ATM and DNA-PK become activated at DNA damage sites and diffuse from the DNA ends in their activated form through the nucleus. However, a diffusion of activated DNA-PK from the DNA end has not been described so far. Thus the exact cause for the pan-nuclear response remains open.

Since at DNA double strand breaks  $\gamma$ H2AX promotes the accumulation of repair factors, a possible influence of nuclear-wide  $\gamma$ H2AX on other repair components was examined. Similar to DNA damage foci, a mutual interdependence between  $\gamma$ H2AX and MDC1, a mediator protein that promotes the increased accumulation of ATM and the 53BP1 recruitment at double strand breaks, occurs also nuclear-wide. It is shown that MDC1 binds to pan-nuclear  $\gamma$ H2AX and increases the phosphorylation of H2AX by ATM and DNA-PK. The binding of MDC1 at the DNA damage sites seems to be diminished by the pan-nuclear response. 53BP1 on the other hand binds strongly in proximity to the DNA damage but a nuclear-wide binding could not be detected, indicating that further signals needed for the recruitment of 53BP1 are missing in the undamaged chromatin. The phosphorylated forms of other protein targets of ATM and DNA-PK, like NBS1 and RPA, did not display a clear pan-nuclear signal. These results do not support a general influence of the pan-nuclear H2AX phosphorylation on the damage response proteins and in this context it does probably not affect the biological effectiveness of heavy ion radiation.

The investigations in this thesis describe a novel nuclear-wide reaction of the cell to the induction of localized, complex DNA lesions and thus provide new insights into the impact of heavy ion irradiation on the molecular level. However, further analyses are needed for a complete understanding of this response.

## 2 Einleitung

Die DNA einzelner Zellen kodiert mit ihrer Basensequenz die genetische Information des Organismus und wird für die Synthese von RNA und Proteinen benötigt. Der Erhalt der DNA-Sequenz ist absolut notwendig für die Zelle und den Organismus, da Fehler in der DNA zum Funktionsverlust der Zellen, zum Zelltod oder zur Krebsentstehung führen können. Die DNA ist täglich einer Reihe von endogenen und exogenen Prozessen ausgesetzt, die zu einer Beschädigung der DNA führen können. DNA-Schäden können bei der Verdopplung der DNA, durch beim Stoffwechsel entstehende reaktive Sauerstoffspezies und durch natürliche Strahlenexposition wie Ultraviolett-Strahlung des Sonnenlichts oder terrestrische Strahlung entstehen. Auch ionisierende Strahlen wie Röntgenstrahlen und Ionenstrahlen führen zur Schädigung der DNA. Schwerionenstrahlen werden in der Therapie von Patienten mit tief im Gewebe liegenden Tumoren wie Gehirntumoren verwendet, da Ionenstrahlen tief im Gewebe präzise eine hohe Dosis deponieren können und dabei das umliegende gesunde Gewebe geschont werden kann. Durch die hohe biologische Wirksamkeit der Ionenstrahlen können besonders strahlenresistente Tumore effizient behandelt werden. Ionenstrahlen sind aber auch ein Teil der kosmischen Strahlung und stellen ein Gesundheitsrisiko bei Langzeitexpeditionen im Welt- raum dar. Daher ist es wichtig, die biologische Wirksamkeit von Ionenstrahlen zu verstehen.

Bei der Beschädigung der DNA können verschiedene Arten von DNA-Schäden entstehen, wie Doppelstrangbrüche, Einzelstrangbrüche und Basenschäden, sowie Verknüpfungen zwischen DNA und Proteinen oder zwischen DNA-Strängen. Für die Reparatur dieser DNA-Schäden stehen der Zelle unterschiedliche Mechanismen zur Verfügung, wodurch die Zelle in der Lage ist, die meisten DNA-Schäden effizient zu reparieren. Durch Ionenbestrahlung werden jedoch verschiedene DNA-Schäden auf engem Raum, sogenannte komplexe DNA-Schäden erzeugt, die schwer zu reparieren sind. Die Reaktion der Zellen auf diese Art der DNA-Schädigung ist Bestandteil andauernder Untersuchungen. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Wirkung von Schwerionenstrahlen auf einen speziellen Mechanismus innerhalb der DNA-Reparatur, der Phosphorylierung des eng mit der DNA assoziierten Proteins H2AX, das für die Effizienz der DNA-Reparatur wichtig ist. Zunächst sollen jedoch die physikalischen Grundlagen ionisierender Strahlung und deren biologische Wirkung vorgestellt werden.

### 2.1 Physikalische Grundlagen ionisierender Strahlung

Ionisierende Strahlung bezeichnet alle Strahlenarten, die beim Auftreffen auf Materie dort Ionisationsereignisse hervorrufen. Dabei werden durch die Bestrahlung Elektronen aus der Atomhülle des bestrahlten Moleküls geschlagen, wobei dieses eine positive Ladung erhält, also ionisiert wird, und kovalente Bindungen in Molekülen zerstört werden. Zur ionisierenden Strahlung gehört die Photonenstrahlung, aber auch Teilchenstrahlung wie Elektronen-, Protonen-, Neutronen-, Alpha- und Schwerionenstrahlung. Photonen niedriger Energie wie sichtbares Licht und Ultraviolett-Strahlung (UV-Strahlung) sind nicht ionisierend, da die Energieübertragung nicht ausreicht, um die Bindungsenergie der Elektronen zu überwinden. Erst Photonen höherer Energie, also Röntgenstrahlen ab Energien von 124 eV und  $\gamma$ -Strahlen sind ionisierend (Hall und Giaccia, 2006). Photonen können auf verschiedene Weise mit der Materie interagieren, wobei die Interaktionsart von der Photonenenergie abhängt (Abb. 1). Bei niedrigeren Energien passiert vor allem der Photoeffekt. Dabei wird die

vollständige Energie des Photons abgegeben und auf das herausgeschlagene Elektron übertragen. Bei höheren Energien (ab ca. 60 keV in Wasser) überwiegt der Compton-Effekt, bei dem das Photon nur einen Teil seiner Energie auf das Elektron überträgt, das Photon von seiner ursprünglichen Flugbahn abgelenkt wird und bei genügend hoher verbleibender Energie weitere Ionisationsereignisse auslösen kann. Bei der Paarbildung entsteht ein Elektron-Positron-Paar, ein Prozess, der nur bei

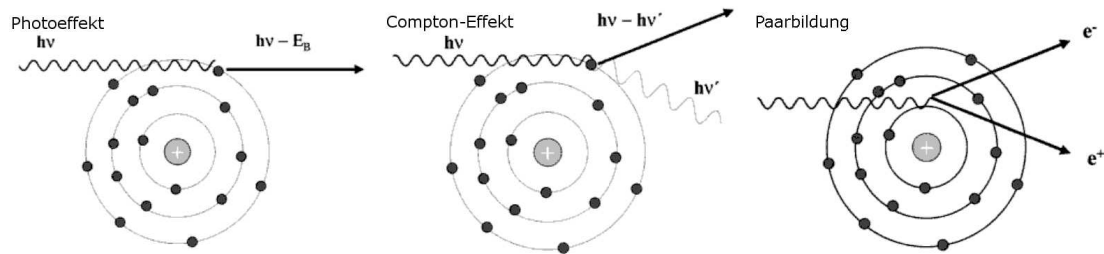


Abbildung 1: **Interaktion von Photonen mit Materie.**  $h\nu$  = Energie des Photons,  $E_B$  = Bindungsenergie des Elektrons,  $e^-$  = Elektron,  $e^+$  = Positron. Nach Kiefer und Kiefer (2003). Erklärung im Text.

sehr hohen Energien stattfindet (ab ca. 1 MeV). Die Art der Interaktion ist aber auch vom bestrahlten Material abhängig, so findet die Photoabsorption häufiger bei Bestrahlung von Molekülen mit höherer Ordnungszahl statt. Die bei der Ionisation der Materie entstehenden herausgeschlagenen sekundären Elektronen können ihrerseits mit der Materie interagieren und bei genügend hoher Energie zusätzliche Ionisationsereignisse auslösen. Bei Teilchenstrahlung schlagen die Teilchen entlang ihrer Flugbahn so lange Elektronen aus dem durchdrungenen Material heraus, bis ihre Energie zu niedrig für weitere Interaktionen ist und sie in der Materie abgestoppt werden. Bei Photonen und Elektronen erfolgt die Energiedeposition in Materie räumlich anders als bei den anderen Teilchen. Bei Photonen und Elektronen sind die Ionisationsereignisse gleichmäßig über die Fläche verteilt, während sich bei schwereren Teilchen die Ionisationsereignisse hauptsächlich um die Flugbahn des Ions konzentrieren. Die insgesamt durch primäre und sekundäre Teilchen in der Materie deponierte Energie ist die Energiedosis ( $D$ ). Sie wird als aufgenommene Energie ( $E$ ) pro Masseinheit ( $m$ ) des absorbierenden Materials angegeben und besitzt die SI-Einheit Gray (Gy):

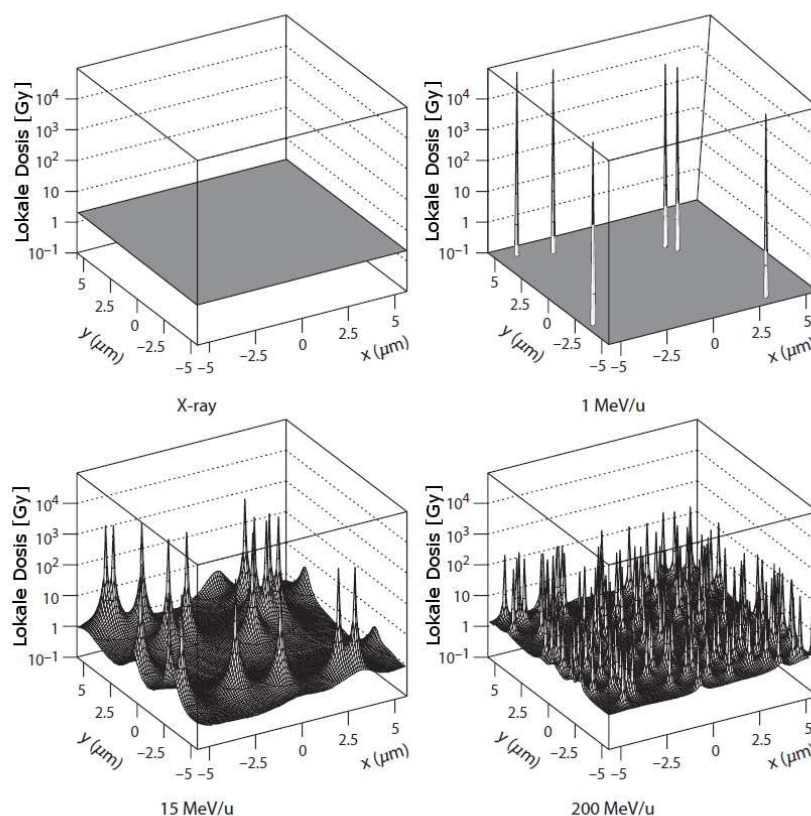
$$D \text{ (Gy)} = \frac{E \text{ (J)}}{m \text{ (kg)}} \quad (1)$$

Die Dosis wird also lokal abgegeben, da Teilchen höherer Masse weniger gestreut werden. Photonenstrahlung wird daher als locker ionisierende Strahlung und Ionenstrahlung als dicht ionisierende Strahlung bezeichnet. In Abbildung 2 ist die unterschiedliche Dosisverteilung dieser beiden Strahlenarten im Flächendosisprofil gezeigt.

Innerhalb des Querschnitts einer Ionenspur ist die Dosis ebenfalls nicht gleichmäßig verteilt. Die Dosis nimmt vom Zentrum der Ionenspur mit  $(1/r^2)$  ab ( $r$  = Radius), was bedeutet, dass die Dosis im Zentrum um ein Vielfaches höher ist als am Rand der Ionenspur (Abb. 3). Dabei ist die maximale Reichweite der sekundären Elektronen von der Energie des Ions abhängig und umso weiter, je höher die Energie des Ions ist. Die maximale Reichweite ( $R_{max}$ ) der Elektronen in Mikrometer ist durch die Energie ( $E$ ) des Ions in MeV/u gegeben:

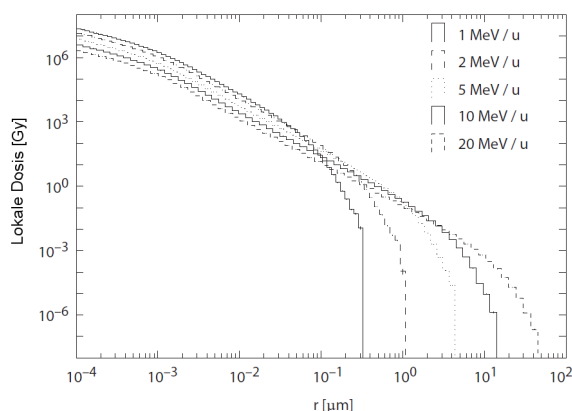
$$R_{max} = 0,05 \cdot E^{1,7} \quad (2)$$





**Abbildung 2: Flächendosisprofil für Röntgenstrahlen und Kohlenstoffionen unterschiedlicher Energie.** Die Flächendosisprofile zeigen die Dosisverteilung bei 2 Gy für unterschiedliche Strahlenarten. Bei Röntgenstrahlen (Xray) ist die Dosis über die gesamte Fläche des bestrahlten Materials gleich. Bei Kohlenstoffbestrahlung mit einer Energie von 1 MeV/u wird die Dosis wenige Nanometer um die Flugbahn des Ions abgegeben. Die lokalen Dosen sind sehr hoch und können auf kleinstem Raum mehrere 1000 Gy betragen. Bei 15 MeV/u ist die Dosisdeposition breiter, der Hauptanteil wird aber im Zentrum der Ionenspur deponiert. Bei höheren Energien muss die Teilchenzahl weiter erhöht werden, um die gleiche Dosis zu erreichen. Die Ionenspuren überlappen und die Dosen in den Zentren der Ionenspuren sind niedriger. Die Dosisverteilung ist also bei höherenergetischen Ionen breiter als bei niederenergetischen Ionen (Scholz, 2003).

Das bedeutet, dass bei sehr niedrigen Energien der primären Teilchen die Reichweite der sekundären Elektronen sehr gering ist und unterhalb eines Mikrometers liegen kann, wobei der Hauptanteil der Dosis im Kern der Spur innerhalb weniger Nanometer deponiert wird. Bei höheren Energien ist die Dosis über eine größere radiale Fläche verteilt und damit die Dosis im Zentrum der Ionenspur geringer als bei Bestrahlung mit niederenergetischen Ionen. Beim Auftreffen von mehreren Ionen in räumlicher Nähe kann es zur Überlagerung der Ionenspuren kommen, wodurch die Dosis in diesen Bereichen aufsummiert wird, ein Aspekt, der in die



**Abbildung 3: Radiales Dosisprofil von Kohlenstoffionen unterschiedlicher Energie.** Nach Scholz (2003).

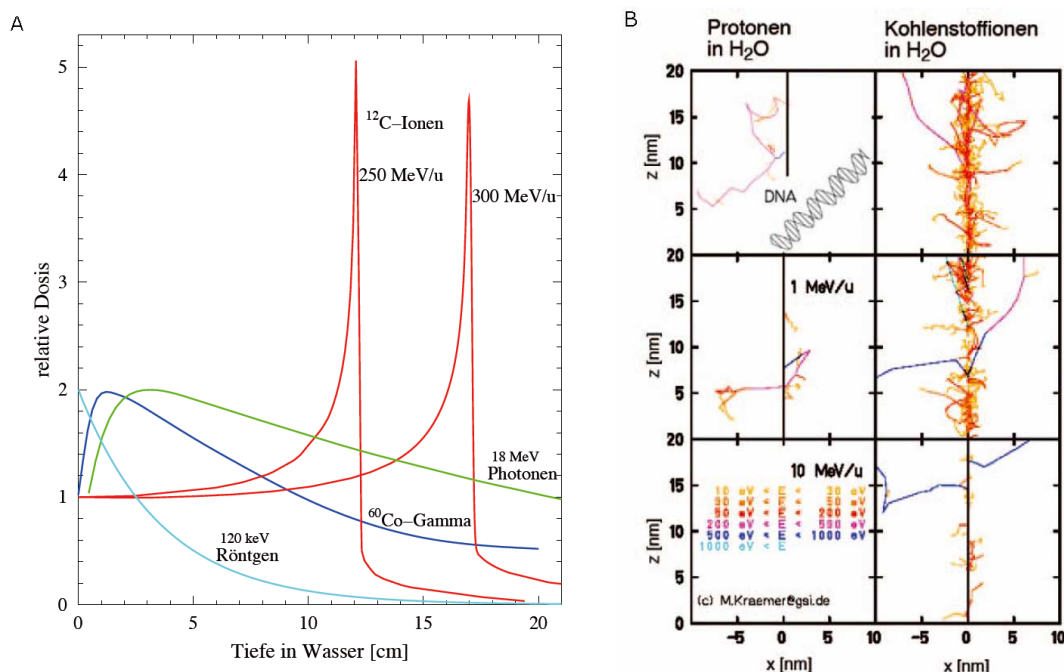
Modelierung der biologischen Effekte von Ionenbestrahlung durch das Local-Effect-Modell (LEM) einkalkuliert wird (Scholz et al., 1997; Scholz, 2003).

Die Dichte der Ionisationsereignisse und somit die Energieabgabe entlang der Flugbahn des Ions kann also unterschiedlich sein und wird über den linearen Energietransfer (LET) beschrieben. Dieser gibt die deponierte Energie pro Wegstrecke an und ist abhängig von der Energie und der Ladung des Teilchens (Bethe, 1930; Bloch, 1933).

$$LET = \frac{E \text{ (keV)}}{d \text{ (}\mu\text{m)}} \propto \frac{Z_{eff}^2}{\beta^2} \quad (3)$$

LET = Linearer Energietransfer, E = Energie, d = Wegstrecke,  $Z_{eff}$  = effektive Ladung,  $\beta = v/c$  ( $v$  = Geschwindigkeit,  $c$  = Lichtgeschwindigkeit)

Beim Durchdringen der Materie gibt ein hochenergetisches Teilchen zunächst wenig Energie an diese ab, da es bei höheren Energien seltener mit der Materie interagiert. Die Energie des Teilchens und damit die Geschwindigkeit wird also erst nur langsam verringert. Nach einer bestimmten Wegstrecke kommt es zum starken Energie- und Geschwindigkeitsverlust, da das Ion immer stärker mit der Materie interagiert. Der LET erhöht sich und die Dosisdeposition steigt rasch an. Der Punkt



**Abbildung 4: Tiefendosisprofil von Photonen und Ionen unterschiedlicher Energie.** (A) Photonen deponieren kurz nach dem Eindringen in die Materie die meiste Energie, während Ionen ein invertiertes Tiefendosisprofil zeigen mit dem sogenannten *Bragg-Peak* als Punkt höchster Dosisdeposition tiefer im Gewebe. Je höher die Energie ist, desto tiefer in das Gewebe dringt die Strahlung ein. (B) Die Dichte der Ionisationsereignisse nimmt mit höherer Ladung und geringerer Geschwindigkeit zu. Daher ist die Ionisationsdichte bei Protonen geringer als bei Kohlenstoffionen gleicher Energie und Ionen lösen auf einer bestimmten Strecke bei niedrigeren Energien mehr Ionisationsereignisse aus als bei höheren Energien, wobei die Reichweite der Elektronen bei niedrigen Energien geringer ist. Zum Größenvergleich ist eine DNA-Doppelhelix dargestellt. Nach Kraft (2008).

höchster Dosisdeposition ist der sogenannte *Bragg-Peak*. Anschließend nimmt das Ion Elektronen auf, wodurch die effektive Ladung verringert wird, die Geschwindigkeit und die Dosis sinken und das

Ion wird sehr schnell nach dem Erreichen des *Bragg-Peak* abgestoppt. Ionen mit höherer Energie können weiter in das Gewebe eindringen als niederenergetische Ionen. Bei Photonen hingegen wird die höchste Dosis je nach Energie der Photonen wenige Zentimeter oder direkt nach dem Eindringen in die Materie abgegeben. Die Dosisdeposition beim Durchdringen der Materie ist für Photonen und Ionen im Tiefendosisprofil gezeigt (Abb. 4 A), wobei die Ionisationsdichte bei Ionen mit niedrigeren Energien zunimmt (Abb. 4 B). Die physikalischen Eigenschaften der Ionenstrahlen haben Vorteile für die Bestrahlung von tiefer im Gewebe liegenden Tumoren und finden daher zunehmend Anwendung in der Therapie von Krebspatienten. Durch das invertierte Tiefendosisprofil der Ionen kann das gesunde Gewebe geschont werden und durch Regulierung der Energie des Ions die Eindringtiefe in das Gewebe bestimmt werden, so dass der Hauptanteil der Dosis im Tumor deponiert wird.

Röntgenstrahlen werden in Röntgenröhren im Vakuum unter Anlegen einer hohen Spannung erzeugt, indem Elektronen von der Kathode zur Anode hin beschleunigt werden. Beim Auftreffen auf das metallische Anodenmaterial erzeugen die Elektronen Photonen unterschiedlicher Energien. Ionenstrahlen werden in Teilchenbeschleunigeranlagen ebenfalls im Vakuum und unter Anlegen eines elektromagnetischen Feldes produziert. Sie sind aber auch ein Teil der kosmischen Strahlung, weshalb ihr Beitrag zum Gesundheitsrisiko für Astronauten bei Langzeitexpeditionen im Weltall und ihre Wirksamkeit auf molekularer Ebene untersucht wird (Durante und Cucinotta, 2008; Maalouf et al., 2011). Normalerweise erfolgt bei Bestrahlung an Teilchenbeschleunigern die räumliche Verteilung der Ionen zufällig. Die Dosis kann anhand des LET und aus der Anzahl der Teilchen pro  $\text{cm}^2$  (Fluenz = F) berechnet werden.

$$D \text{ (Gy)} = 1,602 \cdot 10^{-9} \left( \frac{\mu\text{m} \cdot \text{g} \cdot \text{J}}{\text{keV} \cdot \text{cm} \cdot \text{kg}} \right) \cdot F \left( \frac{1}{\text{cm}^2} \right) \cdot \text{LET} \left( \frac{\text{keV}}{\mu\text{m}} \right) \cdot \frac{1}{\rho} \left( \frac{\text{cm}^3}{\text{g}} \right) \quad (4)$$

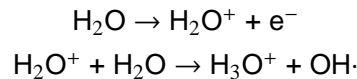
Da Zellen und Gewebe einen hohen Wasseranteil besitzen, wird bei Bestrahlung von Gewebe oder Zellen mit der Dichte ( $\rho$ ) von Wasser gerechnet. Bei speziellen Bestrahlungsanlagen, den sogenannten Mikrosonden, können die Ionen durch Magnete in ihrer Flugbahn abgelenkt werden und so in gewünschte Bereiche beispielsweise innerhalb des Zellkerns von Zellen gezielt werden. Bei der Mikrosonde der GSI wird das Passieren eines Ions dadurch erkannt, dass am Austrittsfenster des Strahlausganges Sekundärelektronen entstehen, die durch einen Detektor erkannt werden. Nach Erreichen der gewünschten Anzahl an Ionen wird der Ionenstrahl automatisch durch eine Blende unterbrochen (Fischer et al., 2003; Heiss et al., 2006). Dadurch kann genau bestimmt werden, mit welcher Anzahl Ionen bestrahlt werden soll. Die Ionen können mit einer Genauigkeit von  $670 \pm 400$  nm in einen gewünschten Punkt gezielt werden und der Durchmesser dieses Punktes, in dem die einzelnen Ionen auftreffen, liegt bei ungefähr 600 nm (Voss et al., 2011).

## 2.2 Biologische Wirkung ionisierender Strahlung

### 2.2.1 Induktion von DNA-Schäden durch ionisierende Strahlung

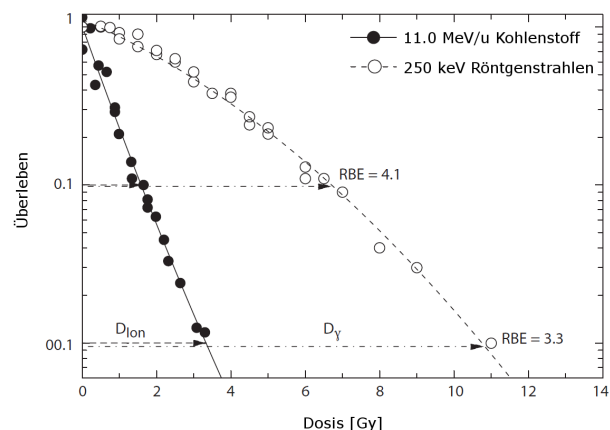
Bei Interaktion von ionisierender Strahlung mit Gewebe interagieren die Strahlen mit den Wassermolekülen in der Zelle. Dabei wird durch die Strahlung ein Elektron aus dem Wassermolekül geschlagen. Das entstehende  $\text{H}_2\text{O}$ -Kation reagiert mit einem weiteren Wassermolekül unter Bildung

eines Hydronium-Kations und eines Hydroxylradikals:



Neben Hydroxylradikalen können durch die Radiolyse des Wassers weitere reaktive Moleküle entstehen. Sie können in der Zelle über wenige Nanometer diffundieren und führen zu Ionisationsereignissen und damit zu weiteren Schäden zusätzlich zu den Schäden, die durch die direkte Wirkung der sekundären Elektronen induziert werden (Hall und Giaccia, 2006). Welchen Anteil die direkten und indirekten Effekte bei der Beschädigung der DNA ausmachen hängt vom LET und vom umgebenden Milieu ab. So kann durch Behandlung mit Radikalfängern wie beispielsweise DMSO (Dimethylsulfoxid) der Anteil der indirekten Schädigung verringert werden. Bei locker ionisierender Strahlung bewirken diese indirekten Effekte in der Zelle ungefähr 70 % des induzierten DNA-Schadens (Chapman et al., 1973). Hirayama et al. (2009) zeigen, dass bei Ionenbestrahlung mit steigendem LET der Anteil der indirekten Wirkung abnimmt, so dass nach Bestrahlung mit einem LET von 2106 keV/μm das Zellüberleben zu ungefähr 30 % durch die indirekte Strahlenwirkung beeinflusst war. Für die Zelle ist die Beschädigung der DNA am schwerwiegendsten, da geschädigte Proteine ersetzt werden können, während der Verlust oder die Veränderung von DNA-Sequenzen für die Zelle fatale Folgen haben können. Durch ionisierende Strahlung können in der DNA verschiedene Arten von Schäden entstehen. Hauptsächlich werden der Verlust von Basen, Basenmodifikationen, Einzelstrangbrüche (ESBs) und Doppelstrangbrüche (DSBs) erwartet (Asaithamby und Chen, 2011). Bei 1 Gy Röntgenbestrahlung entstehen ungefähr 40 DSBs, 1000 ESBs und über 1000 Basenschäden (Ward, 1988; Hall und Giaccia, 2006).

Bei dicht ionisierender Bestrahlung entstehen die verschiedenen DNA-Schäden in enger räumlicher Nähe zueinander. Man spricht von komplexen DNA-Schäden (*clustered damage* (Goodhead et al., 1993) oder *locally multiply damaged sites* (Ward, 1994)), wenn sich zwei oder mehr DNA-Schäden innerhalb ein bis zwei helikalen Windung der DNA befinden. Diese Schäden sind schwer reparierbar im Vergleich zu räumlich getrennten Schäden (Asaithamby und Chen, 2011), desweiteren können bei dicht ionisierender Strahlung durch nah beieinanderliegende ESBs zusätzliche DSBs als bei gleicher Dosis locker ionisierender Bestrahlung entstehen. Die Beschreibung der Wirkung ionisierender Strahlen mit Hilfe des Local-Effect-Modells konnte unter Berücksichtigung der zusätzlich entstehenden DSBs verbessert werden (Elsässer und Scholz, 2007). Die höhere Wirkung



**Abbildung 5: Relative biologische Wirksamkeit von Kohlenstoff- und Röntgenstrahlen.** Kohlenstoffstrahlung hat bei gleicher Dosis einen stärkeren Effekt auf das Zellüberleben als Röntgenstrahlung. Da die Überlebenskurve für Röntgenstrahlung nicht linear ist, ist die RBW von Kohlenstoff bei niedrigeren Dosen höher (Scholz, 2003).

der dicht ionisierenden Strahlung wird bei Betrachtung von Überlebenskurven sichtbar, denn Zellen überleben nach Bestrahlung mit gleicher Dosis dicht ionisierender Strahlung schlechter als nach locker ionisierender Bestrahlung. Ionenstrahlung hat also eine höhere relative biologische Wirksamkeit (RBW). Die RBW ist definiert als das Verhältnis zwischen der Dosis einer Referenzstrahlung ( $D_\gamma$ ), meist Röntgenstrahlung, und der Dosis von Ionenstrahlung ( $D_I$ ), durch die der gleiche Effekt (Isoeffekt) erzielt wird.

$$RBW = \frac{D_\gamma}{D_I} \Big|_{\text{Isoeffekt}} \quad (5)$$

Abbildung 5 zeigt das Überleben von Hamsterzellen (CHO-K1) nach verschiedenen Dosen Röntgen- und Kohlenstoffstrahlen. Da beide Überlebenskurven nicht parallel verlaufen, ergeben sich für unterschiedliche Dosen unterschiedliche RBWs. Eine RBW der Kohlenstoffstrahlung von beispielsweise 3,3 bedeutet, dass nur 1/3 der Dosis Ionenstrahlung nötig ist, um den gleichen Effekt zu erzielen wie durch die einfache Dosis Röntgenstrahlung. Bei niedrigeren Dosen ist die Ionenstrahlung sogar noch effektiver mit einer RBW von 4,1. Bei Bestrahlung mit gleicher Dosis schränkt Kohlenstoffstrahlung das Überleben der Zelle mehr ein als Röntgenbestrahlung. Bei schwereren Ionen mit sehr hohem LET sinkt die RBW wieder, da hier schon bei einer geringen Fluenz eine hohe Dosis deponiert wird, aber nicht alle Zellen getroffen werden. Die deponierte Dosis pro Zelle kann dabei deutlich höher sein als für die Inaktivierung der Zelle nötig ist, so dass dadurch die Effektivität der Ionenstrahlung sinkt. Die RBW ist aber auch von weiteren Faktoren abhängig, wie beispielsweise dem gemessenen Endpunkt, der Fraktionierung der Dosis, dem Sauerstoffgehalt im Gewebe oder dem Zellzyklus. Durch ihre physikalischen und biologischen Eigenschaften sind Schwerionenstrahlen ein vielversprechendes Mittel in der Tumorthherapie und auch die klinischen Daten zeigen eine hohe Effektivität der Bestrahlung von bestimmten Tumorarten mit schweren Ionen (Durante und Loeffler, 2010).

### 2.2.2 Reaktion der Zelle auf die Induktion von DNA-Schäden

Durch ionisierende Strahlung werden in der Zelle DNA-Schäden erzeugt. Es können aber auch DNA-Schäden während der Replikation der DNA oder durch reaktive Sauerstoffspezies (ROS, *reactive oxygen species*), die beim Stoffwechsel gebildet werden, entstehen. Zum Schutz der DNA-Integrität hat die Zelle verschiedene Mechanismen entwickelt, um auf die endogene und exogene Schädigung der DNA zu reagieren. Einer dieser Mechanismen ist das Anhalten bzw. die Verlangsamung des Zellzyklus bei Beschädigung der DNA.

Der Lebenszyklus einer Zelle von ihrer Entstehung bis hin zur Teilung in zwei Tochterzellen wird in vier sogenannte Zellzyklusphasen eingeteilt, die G1-, S-, G2-Phase und die Mitose. In der G1-Phase (*gap*) besitzt die Zelle einfachen DNA-Gehalt mit Einchromatidchromosomen. In der S-Phase (Synthese-Phase) wird die DNA verdoppelt, so dass der DNA-Gehalt zunimmt. In der G2-Phase besitzt die Zelle Zweichromatidchromosomen, also doppelten DNA-Gehalt und schließlich teilen sich die homologen Schwester-DNA-Stränge bei der Mitose auf zwei Zellkerne auf und es entstehen zwei Tochterzellen. Zellen, die sich nicht mehr teilen, da sie ausdifferenziert sind und Zellen, bei denen die Zellteilung durch den Kontakt zu anderen Zellen inhibiert ist, gehen von der G1-Phase in die

sogenannte G0-Phase über, eine Ruhephase, bei der kein Wachstum der Zelle stattfindet. Beim Aufheben der Kontaktinhibition bzw. Stimulierung der Zellteilung durch äußere Signale können Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten (Coller, 2007).

Beim Übergang von einer Zellzyklusphase in die nächste kontrolliert die Zelle unter anderem, ob Schäden in der DNA vorliegen. Ist dies der Fall verlangsamt die Zelle den Zellzyklus und geht zunächst nicht in die nächste Phase über. Diesen Vorgang nennt man Zellzyklusarrest. Die Zelle besitzt vier Kontrollpunkte im Zellzyklus, sogenannte Checkpoints, den G1/S-, den Intra-S-, den G2/M- und den M-Phase-Checkpoint. Nach DNA-Schadensinduktion werden die Checkpoints der Zelle aktiviert. Dies geschieht über die Inhibition der Cyclin-CDK-Komplexe (CDK *cyclin dependent kinase*), die für die Regulierung des Zellzyklus verantwortlich sind (Yata und Esashi, 2009). Während des Zellzyklusarrests versucht die Zelle durch DNA-Reparaturmechanismen, die ursprüngliche Sequenz der DNA wieder herzustellen. Gelingt dies, wird der Zellzyklusarrest aufgehoben und die Zelle kann in die folgenden Zellzyklusphasen übergehen. Allerdings ist die Aktivierung des G1/S- und des G2/M-Checkpoints gewissen Einschränkungen unterlegen. So wird der G1/S-Checkpoint erst etwa 4 bis 6 Stunden nach Bestrahlung vollständig aktiviert und der G2/M-Checkpoint erst nach der Induktion von etwa 10 bis 20 DSBs (Deckbar et al., 2011). Viele Proteine, die Funktionen in der DNA-Reparatur haben, beeinflussen auch die Checkpoint-Kontrolle.

Gelingt es den Zellen nicht, die beschädigte DNA zu reparieren, können sie auf unterschiedliche Weise reagieren. Zelluläre Seneszenz bezeichnet den Vorgang, wenn Zellen nach einer bestimmten Anzahl an Zellteilungen ausdifferenzieren und ihre Teilungsaktivität einstellen. Dieser Prozess kann auch nach irreparabler Beschädigung der DNA eingeleitet werden, so dass Mutationen nicht auf Tochterzellen übertragen werden (Vavrova und Rezacova, 2011). Zellen können auch den programmierten Zelltod, die sogenannte Apoptose einleiten. Dies ist ein genau regulierter Mechanismus, bei dem die DNA fragmentiert wird und die Oberflächenstruktur der Zellmembran so verändert wird, dass die apoptotischen Zellen von Zellen des Immunsystems erkannt und phagozytiert werden (Krysko et al., 2008). Dadurch wird verhindert, dass eine Immunantwort im Organismus ausgelöst wird, im Gegensatz zur Nekrose, bei der die Zellmembran zerstört wird und Bestandteile aus der Zelle nach außen gelangen können, was zu einer inflammatorischen Antwort führt. Werden die DNA-Schäden von der Zelle nicht erkannt oder fehlerhaft repariert oder ist die Zellzykluskontrolle nicht funktionsfähig, kann dies zum Funktionsverlust von Proteinen führen, zur Anhäufung von weiteren Mutationen und schließlich zur unkontrollierten Teilung der Zellen und zur Krebsentstehung (Poehlmann und Roessner, 2010).

### 2.2.3 Überblick über die Reparatur strahleninduzierter DNA-Schäden

Für die verschiedenen Arten von DNA-Schäden stehen der Zelle unterschiedliche Reparaturmechanismen zur Verfügung. An den einzelnen DNA-Reparaturmechanismen sind viele verschiedene Proteinkomponenten beteiligt. Sie können je nach ihrer Funktion in bestimmte Klassen eingeteilt werden. Es sind zunächst Sensorproteine notwendig, um den DNA-Schaden zu erkennen und das Signal für die Einleitung der DNA-Reparatur und der Checkpoint-Aktivierung auszulösen. *Transducer*-Proteine leiten diese Signale weiter, während Mediatorproteine Protein-Protein-Interaktionen vermitteln. Sie können als Bindungsplattform für weitere Reparaturfaktoren dienen, um dadurch das Schadens-Signal weiter zu verstärken und für eine bessere Akkumulation von Reparaturfaktoren in

der Nähe des Schadens zu sorgen. Effektorproteine führen die Reparatur aus, indem sie beschädigte Bereiche entfernen, neue Nukleotide einfügen oder DNA-Enden ligieren.

Der DSB wird als die gefährlichste Schadensart betrachtet (Ward, 1975). Denn bei Beschädigung nur eines DNA-Stranges kann der komplementäre DNA-Strang als Matrize beim Einfügen unbeschädigter Nukleotide dienen, während das beim DSB nicht möglich ist. Darüber hinaus können bei vollständiger Durchtrennung mehrerer DNA-Stränge DNA-Fragmente verloren gehen oder bei der Reparatur DNA-Enden verschiedener Chromosomen zusammengefügt werden, so dass chromosomale Aberrationen entstehen (Agarwal et al., 2006). Daher ist gerade nach ionisierender Bestrahlung die DSB-Reparatur der wichtigste Reparaturmechanismus.

Bei der Nicht-homologen End-zu-End-Verknüpfung (NHEJ *non homologous end joining*) werden die beiden DNA-Enden entweder direkt oder beim Auftreten von überhängenden Enden unter Resektion nur einzelner Nukleotide miteinander ligiert. Dabei bindet zuerst jeweils ein Ku70/Ku80-Heterodimer an die beiden DNA-Enden, wodurch es zur Rekrutierung der DNA-PKcs (*DNA dependent protein kinase catalytic subunit*) kommt. Die katalytische Untereinheit bildet zusammen mit Ku70/Ku80 den vollständigen Enzymkomplex DNA-PK. An DNA-Enden gebundenes DNA-PK kann eine Synapse mit einer zweiten DNA-gebundenen DNA-PK eingehen (Meek et al., 2008). DNA-PK interagiert mit der Endonuklease Artemis und reguliert dessen Aktivität, durch die Haarnadelstrukturen und Überhänge geschnitten werden können (Ma et al., 2002). Die Polymerasen  $\mu$  und  $\lambda$  sind ebenfalls an der Prozessierung der Enden beteiligt (Lieber et al., 2008). Über einen Komplex aus XRCC4/LigaseIV/XLF werden die beiden DNA-Enden schließlich miteinander verknüpft (Grawunder et al., 1997; Ahnesorg et al., 2006). Dieser Reparaturmechanismus ist fehlerhaft, da einzelne Nukleotide verloren gehen können oder nicht zusammengehörige Enden miteinander verknüpft werden können. Trotzdem werden die meisten strahleninduzierten DSBs über diesen Reparaturweg repariert.

Die homologe Rekombination (HR) unterscheidet sich von der Reparatur durch NHEJ dadurch, dass eine weitläufige Resektion der beschädigten DNA stattfindet und für die Neusynthese der DNA der homologe Schwesterstrang als Matrize genutzt wird. Dieser Weg gewährleistet eine fehlerfreie Reparatur und ist vor allem für die genaue Reparatur während der S-Phase wichtig, während der es zur Synthese eines Schwester-DNA-Stranges kommt. Allerdings wird auch ein Teil der in G2-Phase beispielsweise durch Bestrahlung induzierten DSBs durch HR repariert und zwar die DSBs, die im Heterochromatin liegen, die etwa 15 % der DSBs ausmachen (Beucher et al., 2009). Bei der Induktion von komplexen DNA-Schäden durch Schwerionenbestrahlung scheint HR jedoch für einen Großteil der DSB-Reparatur verantwortlich zu sein (Jeggo et al., 2011). Die Entscheidung zwischen HR und NHEJ scheint durch DNA-PK beeinflusst zu werden (Neal und Meek, 2011). Es wird beschrieben, dass bei heterochromatischen und komplexen DNA-Schäden eine schnelle Reparatur durch NHEJ nicht erfolgen kann und so HR begünstigt wird (Neal und Meek, 2011; Shibata et al., 2011). Der DSB wird durch den MRN-Komplex erkannt (Tauchi et al., 2002), wodurch ATM aktiviert und an den Schaden rekrutiert wird (Lee und Paull, 2005). Es kommt zur 5'-3'-Resektion des beschädigten DNA-Stranges, um einen 3'-Einzelstrangüberhang zu generieren, wobei mehrere Nukleasen beteiligt sind wie Mre11, CtIP, Exo1 und Dna2 (Mimitou und Symington, 2009). Der entstandene Einzelstrang wird durch RPA bedeckt und anschließend wird RPA durch Rad51 ersetzt, was über BRCA2 vermittelt wird (Sharan et al., 1997; Pellegrini et al., 2002). Das einzelsträngige DNA-Ende

kann in den Schwesterstrang einwandern, so dass die Synthese neuer Nukleotide an den eingewanderten Strang mit dem Schwester-DNA-Strang als Matrize erfolgen kann und anschließend wird die Struktur wieder aufgelöst (Holthausen et al., 2010).

Durch die Basenexzisionsreparatur (BER) werden einzelne beschädigte Basen, beispielsweise oxidierte Basen und Apurin- und Apyrimidinstellen, und SSBs repariert, die vor allem durch ROS oder auch durch ionisierender Strahlung entstehen können. Die beschädigte Base wird durch DNA-Glykosylasen erkannt und ausgeschnitten (Krokan et al., 2002). Durch die AP-Endonuklease wird ein 3'OH-Ende und ein 5'Deoxyribosephosphat-Ende generiert (Doetsch und Cunningham, 1990). Die DNA-Polymerase  $\beta$  fügt ein neues Nukleotid ein, wobei sie am 5'-Ende schneidet und ein 5'Phosphat-Ende entsteht (Matsumoto und Kim, 1995; Prasad et al., 1998). Über Ligase wird der DNA-Strang wieder verschlossen. SSBs können entweder direkt wieder verschlossen werden oder zunächst nicht ligierbare Enden entfernt werden. Bei der sogenannten *long patch* BER können 2 bis 8 Nukleotide ausgeschnitten werden, wobei die Endonuklease FEN-1, die Polymerasen  $\delta$  und  $\epsilon$ , sowie Ligase I involviert sind (Hegde et al., 2008).

Durch Nukleotidexzisionsreparatur (NER) werden DNA-Schäden repariert, die zu einer Verformung der DNA-Helix führen, beispielsweise Photoprodukte wie Inter-Strang-Vernetzungen oder Thymidin-Dimere, die vor allem nach UV-Bestrahlung entstehen. Es wird unterschieden zwischen der globalen genomischen Reparatur, durch die auch inaktive Gene repariert werden, und der Transkriptionsgekoppelten Reparatur, die bei transkribierten Genen zum Einsatz kommt, wenn RNA-Polymerase II auf einen DNA-Schaden trifft. Beide NER-Wege unterscheiden sich durch die Erkennungsmechanismus des DNA-Schadens. Nach der Erkennung wird die DNA etwa 30 bp um den Schaden durch Helikasen XPB und XPD entwunden, wobei der einzelsträngige Bereich durch RPA und XPA stabilisiert wird. Die Nukleasen ERCC1/XPF und XPG schneiden ca. 24 bis 32 Nukleotide um den Schaden, neue Nukleotide werden eingefügt und der Strang durch Ligase I oder Ligase III verschlossen (Diderich et al., 2011).

Die Induktion von komplexen DNA-Schäden durch Ionenstrahlen stellt die Zelle vor eine besondere Herausforderung, da hier verschiedene Schadensarten, wie DSBs, ESBs und Basenschäden, in räumlicher Nähe zueinander entstehen. Es ist noch nicht hinreichend geklärt, wie die verschiedenen Reparaturwege miteinander koordiniert werden und welche Besonderheiten sich durch komplexe DNA-Schäden für die Reparatur ergeben.

## **2.3 Rolle des Chromatins in der Reparatur von DNA-Schäden**

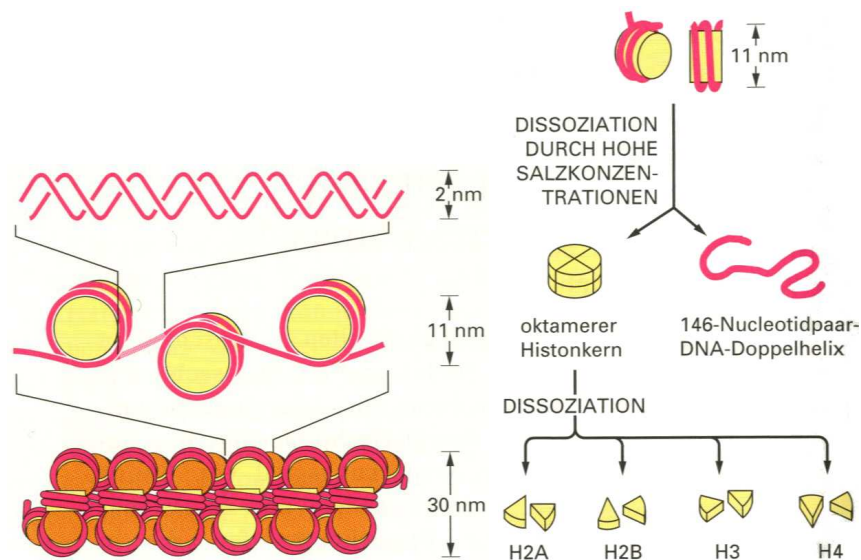
### **2.3.1 Dynamischer Aufbau des Chromatins**

Die DNA liegt im Zellkern nicht nackt vor, sondern in Assoziation mit Histonen und Nicht-Histon-Proteinen. Zusammen mit diesen Proteinen bildet die DNA das Chromatin. Die Histonoktamere, die aus je zwei Molekülen der Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 bestehen, werden von der DNA mit jeweils 146 bp ca. 1,7-mal umwickelt (Luger et al., 1997). Dieser Komplex aus DNA und Histonoktamer wird als Nukleosom bezeichnet (Abb. 6). Zwischen den Nukleosomen befinden sich DNA-Linker-Stücke variabler Länge (Wu et al., 2007a), so dass eine perlenschnurartige Struktur mit einem Durchmesser von 11 nm entsteht. Ein weiteres Histon, das Linker-Histon H1, bindet an den Übergangsstellen zwischen Linker-DNA und Nukleosom an die beiden DNA-Enden, die vom Nukleo-



som abgehen (Hayes und Wolffe, 1993). Über die Bindung von H1 und über Interaktionen zwischen benachbarten Nukleosomen wird die Nukleosomen-DNA-Kette weiter in sich verdrillt (Happel und Doenecke, 2009; McBryant et al., 2006). Dadurch entsteht eine effektive Verpackung der DNA auf kleinem Raum.

Diese Struktur ist jedoch nicht statisch, sondern kann reguliert werden. So wird während der Mitose



**Abbildung 6: Struktur des Chromatins.** Die DNA besitzt einen Durchmesser von 2 nm und ist spulenartig um Histonoktamere gewickelt. Daraus ergibt sich die sogenannte „Perlenkettenform“ mit 11 nm Durchmesser, die aus den Nukleosomen und den dazwischenliegenden Linker-DNA-Stücken besteht. Ein Nukleosom besteht aus dem Histonoktamer mit je zwei Molekülen H2A, H2B, H3 und H4 und der darum gewickelten DNA. Durch weitere Verdrillung entsteht die 30-nm-Faser. Nach Alberts et al. (2001).

die gesamte DNA extrem dicht verpackt, um die Chromosomen an die Äquatorialebene und dann zu den beiden Spindelpolen im Zellkern zu transportieren (Belmont, 2006). In den anderen Zellzyklusphasen wird das Chromatin zur Transkription von Genen geöffnet, während inaktive Gene in kondensiertem Chromatin vorliegen. Auch für die DNA-Reparatur wird das Chromatin geöffnet (Xu und Price, 2011). Diese Strukturveränderungen werden durch posttranslationale Modifikationen von Histonen bewirkt, wodurch es zu einer veränderten Bindung zwischen den Nukleosomen kommt. Zusätzlich werden Chromatin-Remodeling-Komplexe rekrutiert, die Histone aktiv unter ATP-Verbrauch im Chromatin verschieben können (Hargreaves und Crabtree, 2011).

Histone sind basische Proteine mit einem globulären Kern und den seitlich herausragenden N- und C-terminalen Enden. Das Zentrum des globulären Anteils bildet eine  $\alpha$ -Helix, die von kürzeren  $\alpha$ -Helices flankiert ist und mit diesen über Schleifen verbunden ist. Diese Struktur wird als Histonfalte bezeichnet und vermittelt die Dimerisierung von H2A und H2B bzw. H3 und H4 (Abb. 7A). H3 und H4 sind zusätzlich über ihre Seitenketten verbunden, so dass sie ein Tetramer aus je zwei H3- und H4-Molekülen bilden, während H2A und H2B Heterodimere bilden. Zwei H2A-H2B-Dimere und ein H3-H4-Tetramer lagern sich zum Histonoktamer zusammen (Kornberg und Lorch, 1999). Die Enden der Histone können durch zahlreiche Modifikationen wie Phosphorylierung, Acetylierung, Methylierung und Ubiquitinierung verändert werden, wodurch deren Bindung an die DNA beeinflusst, das Chromatin geöffnet und somit die Zugänglichkeit für Reparaturfaktoren gewährleistet werden kann. Außerdem können modifizierte Histone die Reparatur als Mediatorproteine begünstigen, in-

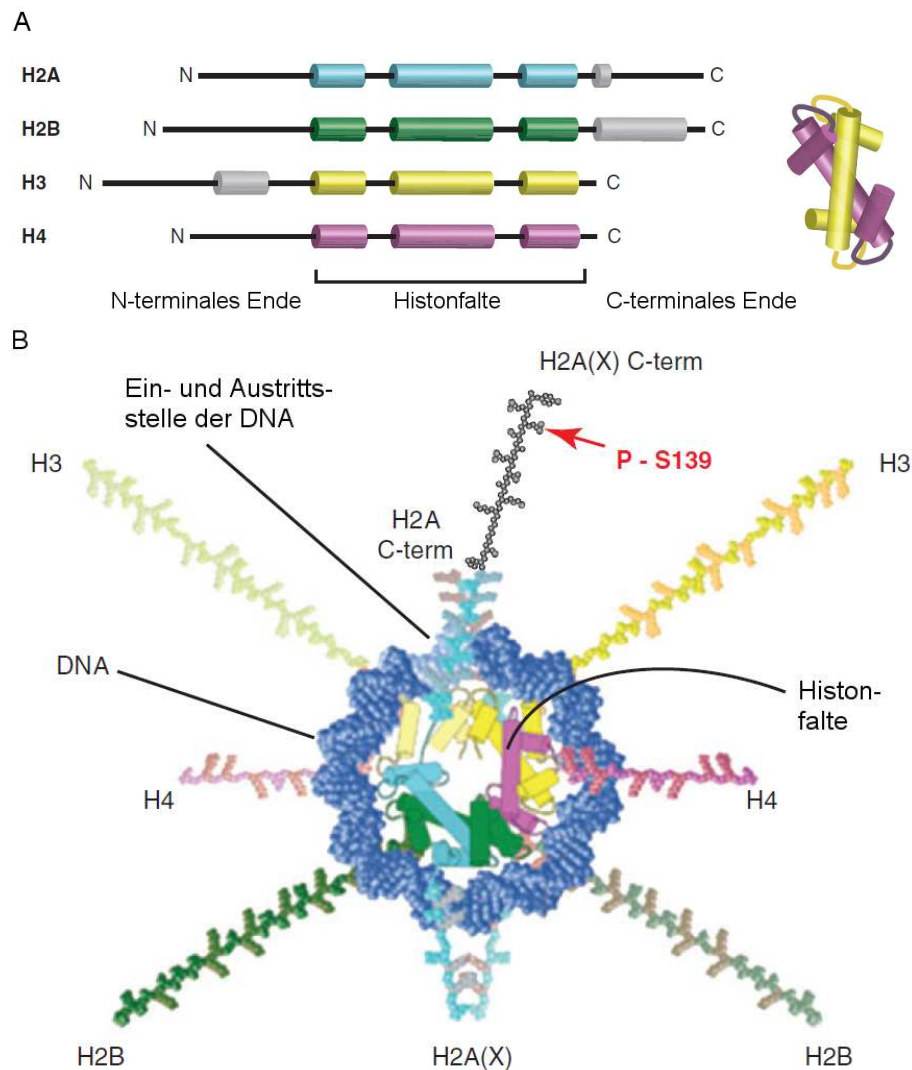
dem sie die Bindung von Enzymen wie Chromatin-Remodeling-Faktoren und Reparaturfaktoren an das Chromatin beeinflussen (Escargueil et al., 2008).

### 2.3.2 Die Bedeutung von H2AX und seinen Modifikationen in der DNA-Reparatur

H1, H2A, H2B, H3 und H4 sind Histon-Familien, die aus verschiedenen Histon-Subtypen bestehen. Diese können verschiedene Funktionen im Chromatin erfüllen. Ein Subtyp von H2A ist das Histon H2AX. Es macht je nach Zelltyp einen unterschiedlichen Anteil des H2A in der Zelle aus von beispielsweise 2,4 % in HeLa Zellen bis zu 25 % in Astrocytomzellen (Rogakou et al., 1998). Es unterscheidet sich von den anderen H2A-Subtypen durch sein C-terminales Ende, welches um 14 Aminosäuren länger ist als das von H2A und ein hoch konserviertes SQE-Motiv (Serin-Glutamin-Glutaminsäure) an Position 139-141 besitzt (Mannironi et al., 1989). Daher erscheint es naheliegend, dass Modifikationen im C-Terminus bei der Funktion von H2AX entscheidend sind.

Die am häufigsten untersuchte Modifikation von H2AX ist die Phosphorylierung im SQE-Motiv an Serin 139 (Abb. 7 B). Die an Serin 139 phosphorylierte Form von H2AX wird als  $\gamma$ H2AX bezeichnet. Es wurde gezeigt, dass pro Gy Bestrahlung 1 bis 2 % des gesamten H2AX phosphoryliert wird (Rogakou et al., 1998). Die Autoren folgerten unter der Annahme, dass bei 1 Gy 35 DSBs entstehen, dass pro DSB 0,03 % des H2AX phosphoryliert wird, so dass bei gleichmäßiger Verteilung von H2AX über das Chromatin ein Bereich von knapp 2 Megabasenpaaren an der Phosphorylierung beteiligt sein müsste. Die Entstehung von  $\gamma$ H2AX an den DSBs kann mittels Immunfluoreszenzfärbung als punktförmige Signale in der Zelle (Rogakou et al., 1999), als sogenannte IRIF (*ionizing radiation induced foci*) detektiert werden. Die Immunfluoreszenzanalysen ergaben jedoch, dass wahrscheinlich noch größere Bereiche um den DSB phosphoryliert werden (Pilch et al., 2003). Diese Modifikation ist bereits wenige Minuten nach Induktion von DNA-Schäden nachweisbar und die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci kann ein Maximum wenige Minuten bis eine Stunde nach Induktion der DSBs erreichen (Rothkamm und Horn, 2009). Die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci korreliert mit der geschätzten Anzahl an DSBs, weshalb  $\gamma$ H2AX als wichtiger Marker für die Quantifizierung von DSBs gerade bei niedrigen Dosen gilt (Rothkamm und Löbrich, 2003). Die Analyse der  $\gamma$ H2AX-Signale in der Zelle ist daher eine wichtige Methode für die Erforschung von DNA-Reparaturmechanismen.

Es sind aber noch weitere Modifikationen von H2AX bekannt. Die konstitutive Phosphorylierung an Tyrosin 142 durch WSTF wird nach IR herunterreguliert, wodurch die H2AX-Phosphorylierung an S139 aufrecht erhalten wird (Xiao et al., 2009). Die Dephosphorylierung an dieser Stelle durch Eya reguliert zumindest in speziellen Gewebe- und Zellarten nach DNA-Schadensinduktion die Entscheidung zwischen Apoptose und Überleben (Cook et al., 2009). Weitere H2AX-Modifikationen, die die Strahlenresistenz erhöhen sind die konstitutive Acetylierung an Lysin 36 durch CBP/p300 (Jiang et al., 2010), die Acetylierung an Lysin 5 durch Tip60 (Ikura et al., 2007) und die Rnf8- und UBC13-abhängige Ubiquitinierung von H2AX (Mailand et al., 2007; Ikura et al., 2007). Die genaue Funktion dieser Modifikationen von H2AX ist Bestandteil andauernder Untersuchungen. Die Bedeutung des Histons H2AX für die Zelle wurde anhand von H2AX-defizienten Mausmodellen untersucht. Es zeigte sich, dass H2AX-Defizienz zu erhöhter Strahlensensitivität, genetischer Instabilität, Immundefizienz, Infertilität männlicher Mäuse, einem Defekt im G2/M-Checkpoint und einer verminderten Rekrutierung von Reparaturfaktoren führt (Celeste et al., 2002; Bassing et al., 2002; Fernandez-Capetillo et al., 2002). Ob oder welche Modifikationen von H2AX dafür verantwortlich sind, war



**Abbildung 7: Aufbau der einzelnen Histone und Anordnung im Nukleosom.** (A) Die Kernhistone H2A, H2B, H3 und H4 besitzen ein gemeinsames zentrales Strukturmotiv aus drei  $\alpha$ -Helices, die sogenannte Histonfalte, über die Histone dimerisieren (farbig dargestellt). (B) Der N- und C-Terminus stehen aus dem Nukleosom heraus und können modifiziert werden. H2A bzw. H2AX befindet sich an der Ein- und Austrittsstelle der DNA. Die Phosphorylierungsstelle zur Bildung von  $\gamma$ H2AX ist rot markiert. Nach Kinner et al. (2008).

zunächst noch ungeklärt. Als Mechanismus zeichnete sich jedoch eine Rolle von H2AX bei der anhaltenden Akkumulation von Reparaturfaktoren (Celeste et al., 2003) und bei der Stabilisierung der DNA-Enden ab (Bassing und Alt, 2004), um die Effizienz der DNA-Reparatur zu erhöhen. Aber auch eine Beteiligung von H2AX bei der Aktivierung der Checkpoint-Kontrolle, bei der Prozessierung von DNA Enden und bei der HR wurden vorgeschlagen (zusammengefasst von Rothkamm und Horn (2009)).

Wie bereits erwähnt kann  $\gamma$ H2AX nach DNA-Schadensinduktion an DSBs durch Immunfluoreszenzfärbung als Foci im Zellkern sichtbar gemacht werden (Rogakou et al., 1999). Auch bei der Reifung von Immunzellen können von der Zelle DSBs in die DNA eingefügt werden. Durch die Rekombinasen RAG1 und RAG2 werden DSBs während der V(D)J-Rekombination in die DNA eingefügt (McBlane et al., 1995), während durch AID (Muramatsu et al., 2000; Revy et al., 2000), BER (Rada et al., 2002; Imai et al., 2003) und die Endonuklease Ape1 (Guikema et al., 2007) DNA-Brüche

während des Immunglobulin-Klassenwechsels induziert werden. Bei der V(D)J-Rekombination und beim Klassenwechsel werden in Zellen des Immunsystems Gensegmente umgelagert, um so eine höhere Vielfalt der Antikörper und T-Zell-Rezeptoren zu ermöglichen (Rivera-Munoz et al., 2007). Obwohl während der V(D)J-Rekombination  $\gamma$ H2AX ebenfalls in Form von Foci detektierbar ist (Chen et al., 2000), scheint H2AX keine Rolle bei diesem Prozess zu spielen (Bassing et al., 2002). Beim Immunglobulin-Klassenwechsel bildet  $\gamma$ H2AX ebenfalls Foci (Petersen et al., 2001) und beim Fehlen von H2AX ist der Klassenwechsel reduziert (Celeste et al., 2002). Die Phosphorylierung passiert an den DSBs also nur lokal, wobei die H2AX-Phosphorylierung nach Schadensinduktion im Bereich transkriptionell aktiver Gene reduziert ist (Iacovoni et al., 2010). Die Phosphorylierung von H2AX kann jedoch auch in Abwesenheit von DSBs induziert werden, beispielsweise bei einer hohen lokalen Akkumulation von Reparaturfaktoren (Soutoglou und Misteli, 2008) oder bei Seneszenz (Pospelova et al., 2009). Darüber hinaus kann  $\gamma$ H2AX nicht nur lokal, sondern auch über den gesamten Zellkern verteilt entstehen. Die kernweite H2AX-Phosphorylierung ist Bestandteil der Reaktion der Zelle auf verschiedene Stresssituationen wie beispielsweise replikativen Stress (Marti et al., 2006; Ewald et al., 2007; de Feraudy et al., 2010), aber auch nach UV-Bestrahlung beim Einsetzen der NER (Marti et al., 2006), als Antwort auf hypotonen Stress (Baure et al., 2009) oder Virusinfektion (Fragkos et al., 2008; Schwartz et al., 2009), während der Apoptose (Mukherjee et al., 2006; Solier et al., 2009) und bei Anwesenheit von vielen DNA-Fragmenten in der Zelle (Quanz et al., 2009b).  $\gamma$ H2AX wurde auch im gesamten Chromatin während der Mitose in verschiedenen Zelllinien detektiert (McManus und Hendzel, 2005; Ichijima et al., 2005). Die Funktion der kernweiten H2AX-Phosphorylierung in diesen Situationen ist jedoch bisher noch unklar. Kürzlich wurde jedoch gezeigt, dass die Phosphorylierung an S139 zwar wichtig für das Überleben nach Induktion von DSBs ist, aber zumindest nach UV-Bestrahlung keinen Einfluss auf das Zellüberleben hat (Revet et al., 2011). Diese Untersuchungen werfen die Frage nach der Ursache und der Bedeutung von kernweitem  $\gamma$ H2AX auf.

## 2.4 Aktivierung von Kinasen der PIKK-Familie durch DNA-Schäden

Die Phosphorylierung von H2AX an S139 kann durch die Kinasen ATM (*ataxia telangiectasia mutated*), ATR (*ATM- and Rad-3-related*) oder DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*) katalysiert werden (Kinner et al., 2008). Die drei Kinasen gehören zur Familie der PIK-Kinasen (PIKK, *phosphatidylinositol 3-kinase related protein kinases*). Sie besitzen ähnliche Struktur wie Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K), phosphorylieren aber nicht Lipide, sondern Proteine. Sie besitzen eine N-terminale HEAT-Domäne, eine FAT-, eine Protein-Kinase-, eine PIKK-regulatorische Domäne und eine C-terminale FATC-Domäne (Lempiäinen und Halazonetis, 2009; Lovejoy und Cortez, 2009). Sie phosphorylieren Serin oder Threonin, auf das ein Glutamin folgt. ATM, ATR und DNA-PK haben zentrale Aufgaben bei der Reaktion der Zelle auf Bestrahlung. Die Bindung an die DNA wird bei allen drei Kinasen durch einen Kofaktor gefördert. Teilweise besitzen die Kinasen unterschiedliche, teilweise überlappende Funktion und sie beeinflussen einander über eine gegenseitige Regulierung der Expression (Chan et al., 1998; Peng et al., 2005; Shrivastav et al., 2009) und gegenseitige Phosphorylierung (Chen et al., 2007; Solier et al., 2009). Die einzelnen Kinasen mit ihren Aktivierungsmechanismen sind im folgenden beschrieben.

#### 2.4.1 ATM (*Ataxia telangiectasia mutated*)

Defekte im ATM-Gen, das auf Chromosom 11q22-23 lokalisiert ist (Savitsky et al., 1995), führen zur autosomal rezessiv vererbten Krankheit Ataxia Telangiectasia. Ca. 1% der Bevölkerung sind heterozygote Träger dieser Krankheit und es sind etwa 1:40000 in der Bevölkerung von dieser Krankheit betroffen (Murken et al., 2006). Sie zeichnet sich durch motorische Bewegungsstörungen (Ataxie), die durch Störungen im Kleinhirn hervorgerufen werden, und sichtbare Vergrößerungen der Kapillargefäße der Haut (Telangiectasie) der Patienten aus. Mutationen im ATM-Gen führen zu Defekten in der Zellzykluskontrolle, sowie zu genomischer Instabilität. Betroffene zeigen eine erhöhte Strahlensensitivität, eine verringerte Immunantwort, neuronale Degeneration und ein erhöhtes Krebsrisiko. ATM ist eines der Proteine, die sehr früh an den DNA-Schaden rekrutiert werden. Es liegt im Nukleoplasma zunächst als inaktives Dimer vor und wird bei DNA-Schadensinduktion an Lysin 3016 durch Tip60 acetyliert. Anschließend kommt es zur Autophosphorylierung an Serin 367, 1893 und 1981. Das Dimer zerfällt dadurch in zwei aktive Monomere (Bakkenist und Kastan, 2003; Sun et al., 2007; Kozlov et al., 2006). Die Rekrutierung der aktiven ATM-Monomere an die DNA erfolgt über NBS1, eine Komponente des MRN-Komplex (Lee und Paull, 2005; Falck et al., 2005). Aktiviertes ATM phosphoryliert Reparatur- und Checkpointkomponenten wie Chk2, NBS1 und MDC1. Es sind hunderte von ATM-Substraten bekannt, auch wenn die Funktion der einzelnen Phosphorylierungen nicht klar sind (Matsuoka et al., 2007). Es zeigt sich jedoch eine Rolle von ATM beim Öffnen von Heterochromatin während der Reparatur (Ziv et al., 2006) und bei der Vermittlung von Resektion über Artemis bzw. CtIP (Riballo et al., 2004; You et al., 2009). Die ATM-Aktivierung kann durch verschiedene DNA-Enden *in vitro* ausgelöst werden, wie doppelsträngige DNA-Enden oder einzelsträngige DNA-Überhänge (Shiotani und Zou, 2009). Auch Chromatinstrukturveränderungen scheinen ATM aktivieren zu können (Bakkenist und Kastan, 2003).

#### 2.4.2 ATR (*ATM and Rad3-related*)

Das ATR-Gen ist auf dem Chromosom 3q22.1-q24 lokalisiert. Während ein Kinasedefekt von ATR in Zellen zu einer erhöhten Strahlensensitivität und einem Verlust der Checkpoint-Kontrolle führt (Wright et al., 1998), führt der Verlust von ATR bei Mäusen zu früher embryonaler Lethalität (Brown und Baltimore, 2000). Eine hypomorphe Mutation, die in einer niedrigen Expression von ATR resultiert, führt zum Seckel-Syndrom (Typ 1), einer seltenen autosomal-rezessiven Erbkrankheit die durch eine ausgeprägte Kleinwüchsigkeit, Mikrozephalie, mentale Retardierung und einer typischen Gesichtsform der Betroffenen gekennzeichnet ist (O'Driscoll et al., 2003).

Die Aktivierung von ATR ist wichtig für die Checkpoint-Kontrolle, indem es Chk1 phosphoryliert (Liu et al., 2000) und es trägt zur Aktivierung von p53 bei (Taylor und Stark, 2001), einem zentralen Faktor in der Zellzykluskontrolle. ATR phosphoryliert außerdem Komponenten der DNA-Reparatur wie BRCA1 (Tibbetts et al., 2000), die Helikasen BLM (Davies et al., 2004) und Werner (Pichierri et al., 2003) und reguliert die nukleäre Lokalisation von XPA, eine Komponente der NER, nach UV-Bestrahlung (Wu et al., 2007b). Auch die H2AX-Phosphorylierung als Antwort auf replikativen Stress ist abhängig von ATR (Ward und Chen, 2001). Kürzlich wurde gezeigt, dass in S-Phase bei Abwesenheit von ATR  $\gamma$ H2AX in Abhängigkeit von ATM und DNA-PK gebildet wird, wodurch die Entstehung von DSBs und damit die Entstehung von Chromosomenaberrationen unterdrückt wird.

Dies deutet auf ein Zusammenspiel von ATR und H2AX bei der Antwort auf replikativen Stress hin (Chanoux et al., 2009).

Für die Rekrutierung von ATR sind einzelsträngige DNA-Bereiche nötig, die mit RPA beladen sind (Zou und Elledge, 2003), wobei möglicherweise außerdem ein benachbarter doppelsträngiger DNA-Bereich für die ATR-Aktivierung vorhanden sein muss (MacDougall et al., 2007; Cimprich und Cortez, 2008). Diese langen einzelsträngigen DNA-Bereiche können während der DNA-Replikation entstehen, wenn das Voranschreiten der Replikationsgabel durch Schäden in der DNA verzögert wird, sie können aber auch während der Reparatur entstehen. Nach Induktion von DSBs wird ATR in Abhängigkeit von ATM und DNA-Resektion aktiviert, wobei die ATM-abhängige Aktivierung auf die S- und G2-Phase beschränkt ist (Jazayeri et al., 2006). Die ATR-Bindung wird über seinen Bindungspartner ATRIP vermittelt (Cortez et al., 2001) und anschließend wird ATR durch TopBP1 aktiviert (Kumagai et al., 2006).

### 2.4.3 DNA-PK (*DNA-dependent protein kinase*)

DNA-PK ist ein am NHEJ beteiligter Komplex, der aus den drei Proteinkomponenten Ku80, Ku70 und der katalytischen Untereinheit DNA-PKcs (*DNA-PK catalytic subunit*) besteht. DNA-PK liegt im Nukleoplasma jedoch nicht als vollständiger Enzymkomplex vor, sondern assembliert erst an der DNA und wird dort aktiviert. Ku70/Ku80 bindet dabei zuerst als ringförmiges Heterodimer sequenzunabhängig an DNA-Enden eines DSBs, wobei es sowohl an glatte DNA-Enden, überhängende Enden und Enden mit Haarnadelstruktur binden kann (Meek et al., 2008; Neal und Meek, 2011). Anschließend kann DNA-PKcs an Ku und an die DNA binden, was zur Konformationsänderung der FAT- und FATC-Domäne führt. Dies bewirkt wahrscheinlich die Kinaseaktivierung der katalytischen Untereinheit. Die gebundene Kinase kann an einen zweiten DNA-PK-Komplex an einem gegenüberliegenden DNA-Ende binden und so eine Synapse bilden, was ebenfalls zur Aktivierung der Kinase beitragen könnte (DeFazio et al., 2002). Die Bindung von DNA-PKcs an DNA über Ku ist essentiell für dessen Aktivierung (Neal und Meek, 2011).

Die Kinaseaktivität von DNA-PK ist wichtig für die Durchführung des NHEJ. Fast alle Komponenten dieses Reparaturweges können durch DNA-PK phosphoryliert werden, allerdings scheint nur die Autophosphorylierung von DNA-PK entscheidend für die Reparatur zu sein. Die Autophosphorylierung der katalytischen Untereinheit verhält sich sehr komplex. Es gibt über 40 potentielle Stellen an denen DNA-PK phosphoryliert werden kann, wobei die Phosphorylierung an verschiedenen Stellen zur Regulierung der Resektion von DNA-Enden beiträgt und damit HR fördern bzw. unterdrücken kann (Cui et al., 2005; Meek et al., 2008; Neal et al., 2011). Autophosphorylierung scheint aber auch zur Inaktivierung des Enzyms und zur Dissoziation von der DNA beizutragen (Chan und Lees-Miller, 1996; Merkle et al., 2002).

Da DNA-PK ein zentrales Enzym für das NHEJ ist, ist es bei der V(D)J-Rekombination essentiell. DNA-PK-defiziente Mäuse sind dementsprechend radiosensitiv und immundefizient (Hill und Lee, 2010). Das menschliche Gen für DNA-PKcs befindet sich auf Chromosom 8q11, während Ku70 und Ku80 auf 22q13 bzw. 2q33-34 lokalisiert sind. Bemerkenswert ist, dass DNA-PK in großer Menge in der Zelle vorhanden ist, es zeigt in Primatenzellen eine 10- bis 50-mal höhere Aktivität als in Nagern (Finnie et al., 1995). Da beim Menschen lange keine Patienten mit einem DNA-PK-Defekt gefunden wurden, wurde vermutet, dass DNA-PK für das Überleben des Menschen essentiell ist

(Meek et al., 2008). Kürzlich jedoch wurde eine hypomorphe DNA-PK-Mutation eines Patienten beschrieben, die wahrscheinlich zu einer eingeschränkten Aktivierung von Artemis führt (van der Burg et al., 2009), einer Nuklease, die für das Öffnen von Haarnadelstrukturen in der DNA verantwortlich ist (Ma et al., 2002).

## 2.5 Mechanismus der H2AX-Phosphorylierung durch ATM, ATR und DNA-PK

Während ATR an einzelsträngiger DNA beispielsweise in der S-Phase beim Zusammenbruch von Replikationsgabeln aktiviert wird und dort H2AX phosphorylieren kann (Ward und Chen, 2001), phosphorylieren ATM und DNA-PK H2AX an DSBs (Stiff et al., 2004). Allerdings ist noch nicht aufgeklärt, wie die lokale H2AX-Phosphorylierung an DSBs über große Bereiche von den DNA-Enden weg mechanistisch verläuft und wie das Abstoppen der Phosphorylierung nach ungefähr zwei Megabasenpaaren reguliert ist.

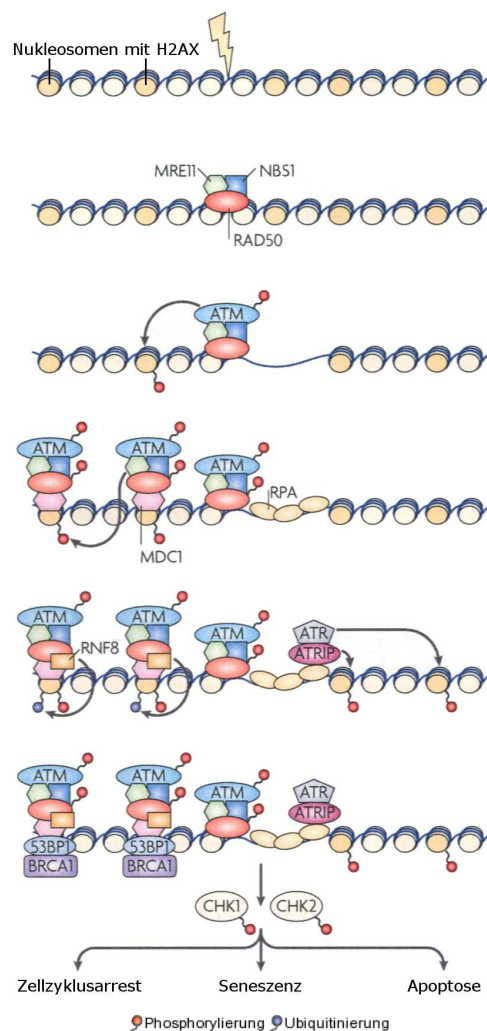


Abbildung 8: H2AX-Phosphorylierung durch ATM und ATR. Nach (Misteli und Soutoglou, 2009).

dass ATM zwar H2AX über weit vom DSB entfernte Bereiche phosphoryliert, MDC1 dort aber keinen



Einfluss auf die Phosphorylierung hat, sondern nur in der Nähe des DSB (Savic et al., 2009). Es ist also weiterhin offen, wie die Phosphorylierung in diesen Bereichen reguliert wird.

Ab welchem Punkt eine weitere Ausbreitung von  $\gamma$ H2AX gestoppt wird, ist noch nicht geklärt. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass die Ausbreitung von  $\gamma$ H2AX zu beiden Seiten des DNA-Bruchs asymmetrisch ist, was auf eine Begrenzung der H2AX-Phosphorylierung durch Strukturen im Chromatin hindeutet (Iacovoni et al., 2010). Die Dephosphorylierung von H2AX an DSBs erfolgt schließlich über PP2A (Chowdhury et al., 2005), PP4 (Chowdhury et al., 2008), PP6 (Douglas et al., 2010) und Wip1 (Macurek et al., 2010) und ist zeitlich gegenüber der Reparatur der DSBs leicht verzögert (Rothkamm und Horn, 2009). Es ist nicht klar, ob die Dephosphorylierung von  $\gamma$ H2AX nach Austausch des Histons geschieht oder im gebundenen Zustand im Chromatin (Kinner et al., 2008). Für die kernweite Phosphorylierung von H2AX ist der Mechanismus in Bezug auf die Induktion, Ausbreitung, zeitliche Regulation und funktionelle Bedeutung bisher noch weitgehend offen. In vielen der beschriebenen kernweiten Antworten scheinen jedoch vor allem ATM und DNA-PK für die Phosphorylierung von H2AX verantwortlich zu sein (vergleiche Kapitel 5.2.3).

## 2.6 Zielsetzung

Ionenstrahlung besitzt eine höhere biologische Wirksamkeit als locker ionisierende Strahlung wie Röntgenstrahlung und ermöglicht eine gezielte Dosisdeposition in der Tiefe des bestrahlten Materials oder Gewebes. Daher ist die Bestrahlung von Tumoren mit Ionen eine vielversprechende neue Methode zur Therapie von Krebspatienten. Ionenstrahlen stellen aber auch ein Gesundheitsrisiko für den Menschen während potentieller Langzeitexpeditionen im Weltraum dar. Die Untersuchung der molekularen Prozesse, die durch Ionenbestrahlung in menschlichen Zellen ausgelöst werden, ist daher wichtig für das Verständnis der Wirkung dicht ionisierender Strahlung. Durch Ionenbestrahlung entstehen im Zellkern auf engem Raum komplexe DNA-Schäden, an die Reparaturproteine teilweise innerhalb weniger Sekunden rekrutiert werden, um die Reparatur dieser für die Zelle gefährlichen DNA-Schäden zu initiieren. Die lokale Entstehung von  $\gamma$ H2AX an DSBs dient zur Aufrechterhaltung der Akkumulation von Reparaturfaktoren an den DNA-Schäden und verbessert dadurch die Effizienz der DNA-Reparatur. Nach Bestrahlung mit schweren Ionen gab es jedoch auch Hinweise auf die Entstehung eines schwächeren kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signals (Jakob et al., 2009). Es stellt sich die Frage, wie die kernweite H2AX-Phosphorylierung ausgelöst wird, welcher Regulierung sie unterliegt und ob durch kernweites  $\gamma$ H2AX DNA-Reparaturproteine gebunden werden, wodurch die Reparatur negativ beeinflusst sein könnte. Deswegen war es das Ziel dieser Arbeit, die kernweite H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung zu charakterisieren.

Es sollte zunächst untersucht werden, ob es sich bei dem detektierten Signal um gebundenes Histon oder um während oder nach der Reparatur aus dem Chromatin ausgetauschtes  $\gamma$ H2AX handelt. Da die DNA durch Ionenbestrahlung massiv geschädigt wird und kernweites  $\gamma$ H2AX auch während der Apoptose entsteht, sollte überprüft werden, ob die kernweite Reaktion im Zusammenhang mit der Induktion von Apoptose steht. Auch ein möglicher Zusammenhang mit einer kernweiten Chromatinstrukturveränderung sollte untersucht werden, da diese ebenfalls eine pan-nukleäre H2AX-Phosphorylierung auslösen können. Die Abhängigkeit der kernweiten Antwort von der Dosis, der Zeit und den verantwortlichen Kinasen könnte Hinweise auf den Entstehungsmechanismus der kernweiten Phosphorylierung liefern und sollte daher untersucht werden. Für diese Analysen sollte



eine mikroskopische Methode zur Quantifizierung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung anhand des Immunfluoreszenzsignals verwendet werden. Um die Genauigkeit dieser Analysen zu verbessern, sollte die gezielte und definierte Bestrahlung mit einzelnen Ionen mit Hilfe der Mikrosonde der GSI angewendet werden. Es sollte untersucht werden, ob die kernweite H2AX-Phosphorylierung durch Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen beeinflusst wird oder durch eine unterschiedliche Dosisverteilung innerhalb einzelner Zellkerne verändert wird. Dadurch sollte außerdem geklärt werden, ob diese Schadensantwort speziell nach Bestrahlung mit schweren Ionen ausgelöst wird oder ob es sich dabei um eine generelle Reaktion der Zelle auf DNA-Schäden handeln könnte, die jedoch erst bei hohen lokalen Dosen detektierbar ist. Der zeitliche Verlauf der kernweiten H2AX-Phosphorylierung nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Ionen sollte untersucht und mit der Kinetik der  $\gamma$ H2AX-Foci verglichen werden, um zu überprüfen, ob beide Prozesse ähnlich reguliert sind. Die potentiell verantwortlichen Kinasen ATM, ATR oder DNA-PK werden durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert. Es sollte daher untersucht werden, welche der Kinasen die kernweite H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung katalysiert, um Rückschlüsse auf den Auslöser der kernweiten Antwort ziehen zu können. Es stellt sich die Frage, inwieweit ein kernweites Auftreten von  $\gamma$ H2AX im Einklang mit seiner Aufgabe steht, die Akkumulation von Reparaturfaktoren am DNA-Schaden zu verstärken. Eine mögliche Auswirkung der kernweiten Antwort auf die Bindung weiterer Reparaturproteine sollte daher untersucht werden.

### 3 Methoden und Materialien

#### 3.1 Methoden

##### 3.1.1 Zellkultur

Die Kultur der Zellen erfolgte in Kulturflaschen (75 cm<sup>2</sup> oder 25 cm<sup>2</sup>) im Brutschrank bei 37 °C, 95 % Luftfeuchtigkeit und 5 % CO<sub>2</sub>-Gehalt. Ein Mediumwechsel wurde alle 3 bis 4 Tage durchgeführt und die Zellen bei Erreichen konfluenter Zelldichte passagiert. Dazu wurde das Zellkulturmedium abgenommen, mit 1 ml PBS gespült und die Zellen durch Inkubation mit 1 ml Trypsin-EDTA-Lösung bzw. 2 ml Accutase (bei Transfektion von Fibroblasten mit siRNA) pro 25 cm<sup>2</sup> für 5 min im Brutschrank abgelöst. Die Zellen wurden durch Aufpipettieren und Spülen gegen das Zellgefäß vereinzelt und anschließend mit einem Zellzählgerät die Zellzahl bestimmt. Für humane Fibroblasten (AG1522) wurde die CPD (*cumulative population doublings* = Anzahl der Verdopplung der Zellzahl) berechnet wie in Kapitel 3.2.1 beschrieben. Für die restlichen Zelllinien wurde die Passagenanzahl nach Auftauen dokumentiert. Die Zellen wurden mit einer CPD von 18 bis 31 und einer Passagenzahl von P3 bis P20 nach Auftauen für Experimente verwendet. Für Versuche wurden die Zellen in Petrischalen (Ø 3,2 cm), auf Deckgläsern (24 mm · 24 mm), die in Petrischalen gelegt wurden, oder in Mikrosondenkammern (Ø 7 mm bzw. Ø 10 mm) auf Polypropylenfolie kultiviert. Eine genaue Beschreibung der Mikrosondenkammern findet sich in Kapitel 3.1.4.3. Um das Anwachsen einer möglichst großen Zellzahl in den Mikrosondenkammern auf der Polypropylenfolie zu gewährleisten, wurden bei der Einsaat 50 µl Zellsuspension direkt auf die Folie gegeben und der Metallrand ausgespart. Nach Inkubation von mindestens 3 h im Brutschrank wurde die Kammer mit 350 µl Medium aufgefüllt. Bis zur Durchführung des Experiments erfolgte bei Mikrosondenkammern jeden Tag ein Mediumwechsel (außer bei Transfektion mit siRNA (*small interfering Ribonukleinsäure*)).

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte in flüssigem Stickstoff bei -196 °C. Für das Einfrieren wurden die Zellen aus den Kulturflaschen geerntet, 1 bis 2 Millionen Zellen für 10 min mit 110 g bei RT zentrifugiert und in 2 ml Kulturmedium mit 10 % DMSO (AA8 und U2OS Zellen), 10 % Glycerin (AG1522 oder XPA Zellen) oder 10 % DMSO und 30 % FCS (restliche Zelllinien) resuspendiert. Die Zellen wurden in Kryoröhrchen im Gefrierschrank langsam auf -80 °C gekühlt in einem mit Isopropanol gefüllten Cryo Freezing Container, der eine Abkühlungsrate von 1 °C/min gewährleistet. Nach 24 h bei -80 °C wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Für das Auftauen der Zellen wurde ein Kryoröhrchen aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und kurz in ein 37 °C Wasserbad gestellt, um die Zellsuspension aufzutauen. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen in 50 ml auf 4 °C gekühltes Medium aufgenommen und das DMSO-haltige Einfriermedium 10 min bei 110 g bei 4 °C abzentrifugiert. Die Zellen wurden in frischem auf 37 °C erwärmten Medium resuspendiert und in Kulturflaschen im Brutschrank kultiviert.

##### 3.1.2 Behandlung der Zellen mit Inhibitoren

###### ATM Inhibition

Für die Inhibition der Kinaseaktivität von ATM wurde der Inhibitor KU55933 verwendet (Hickson et al., 2004). Der Inhibitor wurde in DMSO gelöst, so dass die Stammlösung eine Konzentration von 10 mM betrug. Bei Behandlung der Zellen wurde der Inhibitor 1:1000 in Medium verdünnt, so dass

sich eine Endkonzentration von 10  $\mu\text{M}$  ergab. Die Vorinkubationszeit der Zellen mit Inhibitorhaltigem Medium betrug mindestens 1 h.

### **DNA-PK Inhibition**

Die Kinaseaktivität von DNA-PK wurde durch Verwendung des Inhibitors IC86621 unterdrückt (Kashishian et al., 2003). Die Konzentration der Stammlösung in DMSO betrug 50 mM. Es wurde für alle Experimente eine Verdünnung von 1:250 mit einer Endkonzentration von 200  $\mu\text{M}$  eingesetzt. Eine Ausnahme stellt das erste durchgeführte Experiment mit DNA-PK-Inhibitor dar, bei dem eine Verdünnung von 1:500 (Endkonzentration 100  $\mu\text{M}$ ) verwendet wurde (siehe Abb. 27 und 30). Wie sich jedoch herausstellte wird auch hier eine nahezu vollständige Inhibition von DNA-PK erreicht. Eine Vorinkubationszeit der Zellen mit dem Inhibitor von mindestens 1 h ging den Experimenten voraus.

### **Unspezifische Inhibition von ATM, ATR und DNA-PK**

Eine unspezifische Inhibition von ATM, ATR und DNA-PK wurde durch Behandlung mit Koffein erreicht (Sarkaria et al., 1999). Dazu wurde festes Koffein direkt im Medium gelöst, so dass die Endkonzentration 20 mM betrug. Die Zellen wurden mindestens 1 h vor dem Experiment mit Koffeinhaltigem Medium inkubiert.

### **Unspezifische Inhibition von Acetyltransferasen**

Anacardsäure ist ein unspezifischer Inhibitor der unter anderem die Acetyltransferasen Tip60 (Sun et al., 2006), p300 und PCAF (*p300/ (CREB binding protein) associated factor*) inhibiert. Es wurde eine Stammlösung in DMSO mit der Konzentration 15 mM angefertigt und diese für die Behandlung von Zellen 1:500 in Medium verdünnt, so dass sich eine Endkonzentration von 30  $\mu\text{M}$  ergab. Die Vorinkubation der Zellen dauerte mindestens 30 min.

### **Unspezifische Inhibition von Histon-Deacetylasen**

Durch Verwendung von Trichostatin A (TSA) wurden Histon-Deacetylasen (Yoshida et al., 1990) der Klasse I und II unspezifisch inhibiert. Der Inhibitor wurde in DMSO gelöst, so dass die Stammlösung eine Konzentration von 1,1 mM besaß. Diese wurde 1:3666 verdünnt, um eine Endkonzentration von 0,3  $\mu\text{M}$  zu erreichen. Die Vorinkubationszeit betrug mindestens 1 h.

## **3.1.3 Transfektion mit siRNA**

### **3.1.3.1 Transfektion von Tumorzellen**

Die für die Transfektion verwendeten U2OS Zellen wurden bei einer Konfluenz von etwa 90 % durch Trypsinieren geerntet und mit einer Dichte von 75 000 Zellen/ml in Ø 3,2 cm Petrischalen und einer Zelldichte von 15 000 Zellen/ml in Mikrosondenkammern eingesät. 24 h nach der Einsaat erfolgte die Transfektion mit siRNA. Dazu wurde unter sterilen und Ribonuklease-freien Bedingungen ein zehnfach konzentrierter Transfektionsansatz vorbereitet mit dem Endvolumen 200  $\mu\text{l}$  (bei Verwendung von Petrischalen) bzw. 40  $\mu\text{l}$  (bei Verwendung von Mikrosonden), der aus siRNA und 1/25 Volumen INTERFERin in OptiMEM bestand. Die Menge der siRNA wurde dabei so gewählt, dass die Endkonzentration 10 bzw. 20 nM entsprach (siehe Kapitel 3.2.3 Tabelle 2). Der Transfektionsansatz wurde

für 10 sec gevortext, kurz anzentrifugiert und für 10 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium in den Zellgefäßen mit dem 0,9-fachen des Endvolumens (1,8 ml bei Petrischalen, 360 µl bei Mikrosondenkammern) frisches Medium ersetzt. Anschließend wurde der Transfektionsansatz langsam unter Schwenken des Zellgefäßes zugetropft. Bei Mikrosondenkammern wurde der Transfektionsansatz in die Kammer gegeben und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren mit dem Medium gemischt. Es erfolgte kein weiterer Mediumwechsel bis zur Bestrahlung 48 h bzw. 72 h nach der Transfektion (siehe Kapitel 3.2.3 Tabelle 2).

### **3.1.3.2 Transfektion von Fibroblasten**

Die Fibroblastenzelllinie NFFhTert wurde direkt mit der Einsaat transfiziert. Die Zellen wurden so kultiviert, dass sie zum Zeitpunkt der Ernte über 90 % konfluent waren. Für das Ablösen der Zellen wurde Accutase verwendet. Für 2 ml Zellsuspension wurde ein Transfektionsansatz aus 100 µl OptiMEM, 12 µl Hiperfect und siRNA angesetzt, so dass die Endkonzentration der siRNA nach Zugabe zur Zellsuspension 10 bzw. 20 nM entsprach (siehe Kapitel 3.2.3 Tabelle 2). Der Transfektionsansatz wurde 10 sec gevortext, kurz anzentrifugiert und 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde zur Zellsuspension gegeben, die eine Konzentration von 110 000 Zellen/ml für Petrischalen bzw. 22 000 Zellen/ml für Mikrosondenkammern aufwies. Die Zellen wurden in entsprechende Zellgefäße eingesät und 48 h bzw. 72 h bis zur Bestrahlung mit dem Transfektionsansatz inkubiert (siehe Kapitel 3.2.3 Tabelle 2).

## **3.1.4 Bestrahlung**

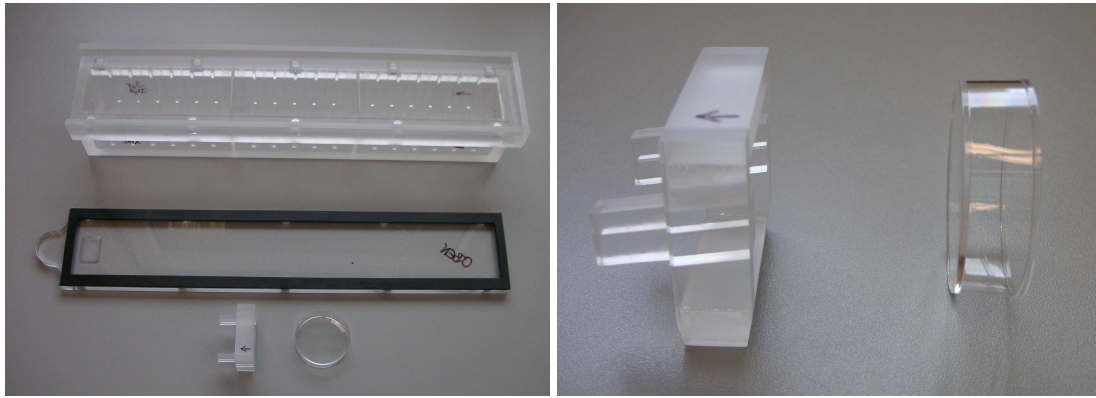
### **3.1.4.1 Röntgenbestrahlung**

Die Bestrahlung der Zellen in Ø 3,2 cm Petrischalen bzw. auf 24 mm · 24 mm Glasplättchen in Petrischalen mit Röntgenstrahlen wurde an einer IV320-13 Röntgenröhre durchgeführt. Die Dosisrate lag zwischen 1 und 2 Gy/min, die Stromstärke und -spannung bei 16 mA und 250 kV. Die Dosismessung erfolgte über ein SN4 Dosimeter.

### **3.1.4.2 Ungerichtete Schwerionenbestrahlung am UNILAC**

Die Bestrahlung von Zellen am UNILAC (*Universal Linear Accelerator*) mit niederenergetischen Ionen erfolgte in verschiedenen Geometrien. Der Zellrasen konnte senkrecht oder seitlich bestrahlt werden, so dass bei Markierung der DNA-Schäden durch Immunfluoreszenzfärbung diese als punktförmige Foci oder als Spur quer durch den Zellkern in der Aufsicht erscheinen (Jakob et al., 2003). Für die Senkrechtbestrahlung wurden die Zellen in Ø 3,2 cm Petrischalen eingesät. Vor der Bestrahlung wurden die Petrischalen senkrecht ohne Deckel in spezielle für die UNILAC-Bestrahlung gefertigte Plexiglas Magazine gestellt, die eine Bestrahlung bis zu 20 Proben pro Magazin erlauben (Abb. 9). Die Magazine wurden mit Medium ohne Zusätze gefüllt und konnten luftdicht verschlossen werden. In der biologischen Bestrahlungsanlage am Beschleuniger wurde der Magazindeckel geöffnet und direkt vor der Bestrahlung die Petrischalen einzeln mit einem aus dem Kontrollraum steuerbaren Greifer aus dem Medium gehoben und vor den Strahlengang gehalten. Nach der Bestrahlung erfolgte das automatische Absetzen der Petrischale in das Magazin, so dass die Zellen nur für wenige Sekunden durch einen dünnen Mediumfilm bedeckt waren.

Für die Schrägbestrahlung wurden die Zellen auf 24 mm · 24 mm Glasplättchen eingesät. Diese



**Abbildung 9: Magazin und Probenhalter für die ungerichtete Bestrahlung am UNILAC.** Die Magazine für die ungerichtete Bestrahlung am UNILAC besitzen ungefähr 30 cm Seitenlänge, können mit Medium befüllt und über Magnete mit einem Deckel verschlossen werden (links). Es können bis zu 20 Petrischalen für eine senkrechte Bestrahlung von Zellen oder bis zu 10 Probenhalter (rechts in größerer Aufnahme) für die seitliche Bestrahlung von Zellen in das Magazin eingesetzt werden.

wurden schräg in speziell angefertigte Plexiglasprobenhalter eingesetzt, die wiederum in die oben beschriebenen Magazine gesetzt werden konnten (Abb. 9). Der Greifer in der Bestrahlungsanlage hebt diese Probenhalter vor den Strahlengang. Das verbleibende Medium im unteren Bereich des Glasplättchens führt zum Abstoppen der Ionen vor dem Erreichen der Zellschicht und verhindert so eine Bestrahlung der Zellen in diesem Bereich. Nach der Bestrahlung wird der Probenhalter automatisch wieder in das Magazin gesetzt.

#### 3.1.4.3 Gezielte Schwerionenbestrahlung am UNILAC mit der Mikrosonde

Mit Hilfe der Mikrosonde kann die Anzahl der Ionen, mit der bestrahlt werden soll, genau bestimmt werden, bis hin zur Bestrahlung mit einzelnen Ionen. Dabei kann der Auftreffpunkt der Ionen vorher bestimmt werden, wobei dieser Auftreffpunkt einen Durchmesser von 600 nm besitzt, während die Treffergenauigkeit bei  $670 \pm 400$  nm liegt (Voss et al., 2011). Weniger als 1 % Fehler ergeben sich aus doppelten, fehlenden oder fehlgeleiteten Treffern (Fischer et al., 2003). Mit einem 20x Objektiv können die Zellen in einem Feld von  $487 \mu\text{m} \cdot 358 \mu\text{m}$  Fläche erkannt und mit der Mikrosonde bestrahlt werden.

Eine genaue Beschreibung des Aufbaus der Mikrosondenbestrahlungsanlage sowie der verwendeten Zellgefäße befindet sich in der Arbeit von Heiss et al. (2006). Die Zellen wurden für die Bestrahlung an der Mikrosonde in speziellen Zellgefäßen, sogenannten Mikrosondenkammern, kultiviert (Abb. 10). Diese besitzen eine Seitenlänge von 20 mm und bestehen aus einem Rahmen aus rostfreiem Stahl mit einem Loch von 7 mm oder 10 mm  $\varnothing$  in der Mitte. Die Unterseite der Kammer wurde mit einer Polypropylenfolie mit einer Dicke von 4  $\mu\text{m}$  bespannt. Dazu wurde die Folie zuerst für 3 h in 2-prozentige Lipsollösung gelegt und anschließend mehrmals mit deionisiertem Wasser gewaschen und über Nacht in Wasser gelegt. Nach dem Trocknen der Folie wurde sie durch Erwärmen von Stearinwachs an den Kammern fixiert. Zusätzlich wurden zwei Ecken aus Polypropylenfolie (ungefähre Seitenlänge 2 mm) an den Rand zwischen Metall und Polypropylenfolie mit Wachs befestigt, die später als Referenzmarken dienten, um die Position der bestrahlten Felder zu dokumentieren. Die Sterilisation der Kammern erfolgte durch 20-minütiges Eintauchen in 70-prozentigem Ethanol. Wenige Tage vor der Zelleinsaat wurden die Kammern mit Cell-Tak ( $3,5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) beschichtet, einem

Proteingemisch gewonnen aus der Miesmuschel (*Mytilus edulis*), wodurch ein Anwachsen der Zellen auf der Folie gewährleistet wird. Dazu wurde die Cell-Tak-Lösung frisch angesetzt, 100 µl davon in Mikrosondenkammern mit Ø 7 mm (0,39 cm<sup>2</sup>) auf die Folie pipettiert und für 20 min in der Kammer belassen. Anschließend wurde die Cell-Tak-Lösung abgenommen und die Kammern dreimal mit Wasser gewaschen. Die Kammern konnten wenige Tage vor der Bestrahlung bei 4 °C gelagert werden und wurden kurz vor der Einsaat auf RT gebracht. Die Einsaat der Zellen in Mikrosondenkammern ist in Kapitel 3.1.1 beschrieben.

Direkt vor der Bestrahlung werden die einzelnen Zellen automatisch durch die verwendete Software

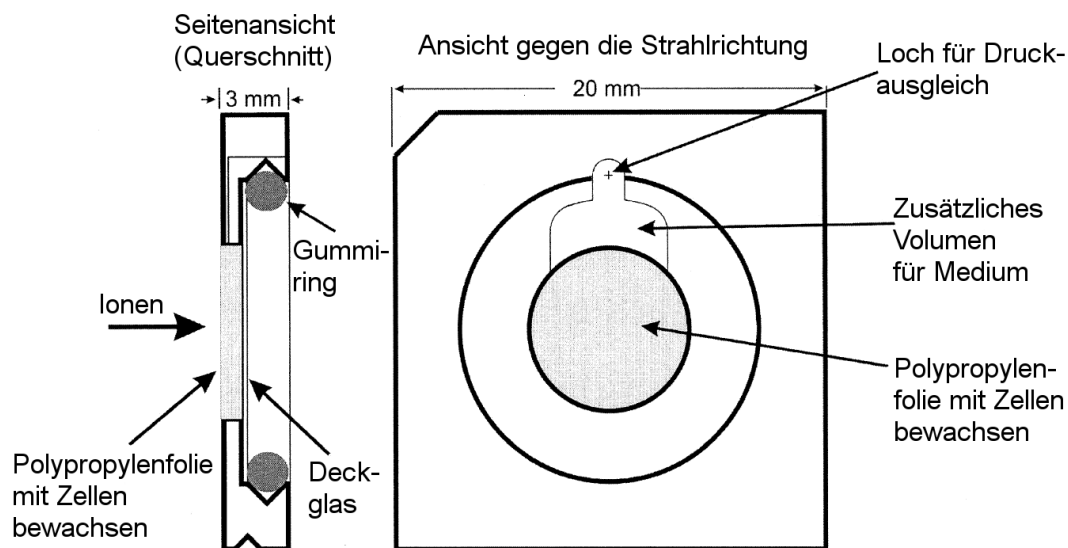


Abbildung 10: **Aufbau der Mikrosondenkammern.** Für die gezielte Bestrahlung an der Mikrosonde werden die Zellen auf einer 4 µm dicken Polypropylenfolie, die von einem Metallrahmen umgeben ist, eingesät. Die Kammer wird bei Bestrahlung durch ein Deckglas verschlossen und dieses mit einem Gummiring fixiert. Die Kammer wird senkrecht vor dem Strahlgang befestigt. Nach Heiss et al. (2006).

erkannt. Dafür wurden die Zellkerne mit dem Lebendzell-Farbstoff Hoechst (100 nM in Medium) für 45 bis 60 min im Brutschrank gefärbt. Nach der Färbung wurden die Zellen einmal mit normalem Zellkulturmedium ohne Hoechst gewaschen und dann bis zur Bestrahlung in normalem Medium im Brutschrank gehalten. Für die Bestrahlung wurde das Kulturmedium durch Medium ersetzt, das 20 mM Hepes (pH 7,2) enthielt, um den pH-Wert zu stabilisieren. Dieses Medium wurde zuvor sterilfiltriert, um kleine Partikel zu entfernen, die sich bei der Detektion der Zellkerne störend auswirken könnten. Die Kammern wurden mit einem Deckglas verschlossen und dieses mit einem Silikon-Gummiring befestigt. Die Kammern wurden einzeln bestrahlt und dafür senkrecht direkt vor dem Strahlengang befestigt. Es wurde darauf geachtet, dass der Zeitraum vom sterilen Verschließen bis zum Öffnen der Kammern nach Bestrahlung nicht mehr als 20 min betrug. Die Dosis wurde wie in Kapitel 2.1 berechnet, wobei als Fluenz die Anzahl der Teilchen/Zellkernfläche verwendet wurde ( $1 \text{ Ion/Zellkern} = 1 \text{ Teilchen}/240 \mu\text{m}^2 = 416\,666 \text{ Teilchen}/\text{cm}^2$ ). Die Bestrahlung mit der Mikrosonde bietet Vorteile wie die gezielte Steuerung des Auftreffpunktes und der Anzahl der Ionen, allerdings ist sie auch mit einem höheren Aufwand verbunden. Es kann immer nur eine Probe in die Halterung eingebaut werden, während bei ungerichteter Bestrahlung in ein Magazin bis zu 20 Proben eingesetzt werden können. Für die Zellkernererkennung an der Mikrosonde muss zunächst auf die

Ebene der Zellen fokussiert werden, anschließend erfolgt die Positionsbestimmung der Referenzmarken. Die Auswahl von Bestrahlungsfeldern, die Erkennung der Zellkerne und die Bestrahlung erfolgt automatisch. Bestrahlungsfelder und Zellkerne können gegebenenfalls auch manuell ausgewählt werden und die Anzahl der Ionen sowie Bestrahlungsmuster können innerhalb einer Probe für verschiedene Bestrahlungsfelder geändert werden. Diese Bestrahlungsmethode bietet also eine Vielzahl an Möglichkeiten, benötigt jedoch mehr Zeit, da die Bestrahlung der einzelnen Proben sowie der Einbau und Ausbau der Proben aufwendiger ist als bei ungerichteter Bestrahlung. Es kann mit dieser Methode deshalb nur eine limitierte Anzahl an Proben bestrahlt werden.

#### 3.1.4.4 Verwendete Ionen

Für die ungerichtete Bestrahlung am UNILAC und die gerichtete Bestrahlung an der Mikrosonde wurden Ionen unterschiedlichen LETs verwendet. In Tabelle 1 sind der LET und die Energie der Ionen bei Erreichen des bestrahlten Objekts (Energie auf Target) angegeben. Für die Bestrahlung an der Mikrosonde wurde die Dosis bei Bestrahlung mit 1 Ion/Zellkern berechnet wie im vorigen Kapitel beschrieben. Bei ungerichteter Bestrahlung wurden die Zellen meist schräg bestrahlt, so dass sich bei Betrachtung der Zellkerne aus dem veränderten Winkel der Bestrahlung eine andere Fläche der Zellkerne ergibt als bei senkrechter Bestrahlung. Daher wurde eine Berechnung der Dosis bei 1 Ion/Zellkern für die ungerichtete Bestrahlung nicht durchgeführt. Die Berechnung des LETs für UNILAC-Strahlzeiten wurde mit dem Programm ATIMA in der Abteilung Biophysik der GSI durchgeführt, die LETs bei Strahlzeiten an der Mikrosonde wurden in der Abteilung Materialforschung mit dem Programm SRIM berechnet. Die mit beiden Programmen berechneten LET-Werte können sich um ungefähr 10 % unterscheiden.

Ion	Isotop	LET (keV/ $\mu$ m)	Energie auf Target (MeV/u)	Dosis bei 1 Ion/ Zellkern (Gy)	Bestrahlung
Kohlenstoff	$^{12}\text{C}$	170	9,9		UNILAC
		290	4,8	0,19	Mikrosonde
Stickstoff	$^{14}\text{N}$	400	4,8	0,27	Mikrosonde
Neon	$^{20}\text{Ne}$	460	9,6		UNILAC
Chrom	$^{54}\text{Cr}$	2630	6,5		UNILAC
		3000	4,8	2,0	Mikrosonde
Eisen	$^{56}\text{Fe}$	3050	6,1		UNILAC
Nickel	$^{64}\text{Ni}$	3800	4,8	2,5	Mikrosonde
Krypton	$^{84}\text{Kr}$	4600	7,2		UNILAC
Ruthenium	$^{96}\text{Ru}$	7060	4,1		UNILAC
Xenon	$^{136}\text{Xe}$	8660	4,7		UNILAC
		9300	4,8	6,1	Mikrosonde
Gold	$^{197}\text{Au}$	12800	4,8		UNILAC
		12800	4,8	8,5	Mikrosonde
Uran	$^{238}\text{U}$	15000	6,2		UNILAC

Tabelle 1: Energien und LETs der verwendeten Ionen

### 3.1.5 Bestimmung des klonogenen Überlebens von Zellen

Um die Koloniebildungsfähigkeit von Zellen nach Bestrahlung zu ermitteln, wurden diese zuerst in Ø 3,2 cm Petrischalen eingesät. Bei Erreichen konfluenter Zelldichte wurden die Zellen bestrahlt und 1 h später durch Trypsinieren geerntet. Anhand der nach Literaturdaten erwarteten Überlebensrate und der Anheftungseffizienz wurde die Zellzahl berechnet, die eingesät werden muss, damit sich ca. 100 koloniebildungsfähige Zellen im Zellgefäß befinden. Diese Zellzahl wurde bei Verwendung von AG1522 Zellen in 75 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen eingesät und die Zellen im Brutschrank inkubiert. Für jede Dosis wurden drei Flaschen eingesät. Das Medium wurde nach 7 Tagen erneuert. Nach 14 Tagen erfolgte die Fixierung und Färbung der Zellen mit 9 ml Methylenblaulösung pro 75 cm<sup>2</sup> Flasche für 30 min. Anschließend wurden die Zellen kurz mit Wasser gespült und getrocknet. Alle Kolonien, die mindestens aus 50 Zellen bestanden, wurden in die Auswertung einbezogen. Das Überleben kann folgendermaßen berechnet werden:

$$S = \frac{N_K}{N_Z \cdot AE} \quad (6)$$

S = Überleben,  $N_K$  = Anzahl Kolonien,  $N_Z$  = Anzahl Zellen bei der Einsaat, AE = Anheftungseffizienz

### 3.1.6 Immuncytochemische Methoden

#### 3.1.6.1 Paraformaldehyd-Fixierung

Für die Fixierung von Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie ohne Extraktion von löslichem Protein wurde zunächst das Kulturmedium entfernt, die Zellen kurz mit PBS gewaschen und anschließend 15 min mit 2 % PFA in PBS bei RT fixiert. Die Permeabilisierung der Zellen erfolgte durch 10-minütige Inkubation mit 0,5 % Triton X-100 in PBS. Nach 2-maligen Waschen mit PBS für jeweils 3 min wurden unspezifische Bindungsstellen durch Inkubation mit 0,4 % BSA in PBS abgesättigt. Dieser Schritt wurde entweder bei RT für 20 min durchgeführt oder bei 4 °C mindestens über Nacht oder einige Tage bis zur Färbung der Zellen. Bei Lagerung der fixierten Proben über mehrere Tage bis drei Wochen bei 4 °C wurde die BSA-Lösung mit 0,01 % Natriumazid versetzt. Bei der Fixierung von Zellen in Mikrosondenkammern betrug der Fixierungsschritt 20 min, der Permeabilisierungsschritt 7 min, da ein Ablösen der Zellen von der Polypropylenfolie vermieden werden sollte.

#### 3.1.6.2 Fixierung mit Extraktion löslicher Proteine

Sollte lösliches und locker an das Chromatin gebundenes Protein vor der Fixierung extrahiert werden, wurden die Zellen kurz mit PBS gewaschen, anschließend 5 min auf Eis mit Cytoskeleton Puffer, danach 5 min auf Eis mit Cytoskeleton Stripping Puffer inkubiert. Es wurde dreimal für je 3 min mit eiskaltem PBS gewaschen und 30 min bei RT mit Modified Streck Tissue Fixative fixiert (Kodym und Hörth, 1995). Zur Permeabilisierung wurden die Zellen 10 min mit 0,5 % Triton X-100 in PBS inkubiert, dann 5 min mit PBS gewaschen und mit 0,4 % BSA in PBS wie unter Abschnitt 3.1.6.1 beschrieben blockiert.



### 3.1.6.3 Immunfluoreszenzfärbung

Spezifische Antikörper wurden entsprechend Kapitel 3.2.4 Tabelle 3 in 0,4 % BSA in PBS verdünnt. Für die Färbung von Zellen in Ø 3,2 cm Petrischalen wurden 50 µl Antikörperlösung verwendet und diese mit einer runden Mylarfolie abgedeckt, um eine gleichmäßige Verteilung der Antikörperlösung zu gewährleisten. Für die Färbung von Zellen in Mikrosondenkammern wurden 100 µl Antikörperlösung verwendet. Die Inkubation erfolgte bei RT für 1 h in einer feuchten Kammer. Es wurde dreimal für je 5 min mit PBS gewaschen und mit der Zweitantikörperlösung (Verdünnung entsprechend Kapitel 3.2.4 Tabelle 4) in 0,4 % BSA in PBS für 45 min in einer feuchten Kammer inkubiert. Da es sich um Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelte Antikörper handelte, wurden ab hier alle Schritte im Dunkeln durchgeführt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für je 5 min wurde die DNA angefärbt. Dazu wurde mit Propidiumiodid (PI, 1,5 µM mit 100 µg/ml frisch zugesetzter Ribonuklease) oder ToPro-3-Lösung (1 µM) für 15 bis 20 min gefärbt. Nach ToPro-3-Färbung erfolgte nur ein kurzes Waschen mit Wasser, um ein Auswaschen des Farbstoffs zu vermeiden. Nach PI-Färbung folgte zweimaliges Waschen für je 5 min mit PBS und ein anschließender kurzer Waschschrift in Wasser. Die Proben wurden mit einem Tropfen bzw. 5 oder 10 µl bei Mikrosondenkammern Einbettmedium versetzt und mit einem Deckglas bedeckt bzw. auf einen Objektträger (bei Einsaat auf Deckgläsern) gelegt. Die Proben wurden bis zur Mikroskopie im Dunkeln bei 4 °C gelagert.

### 3.1.6.4 Annexin-Färbung

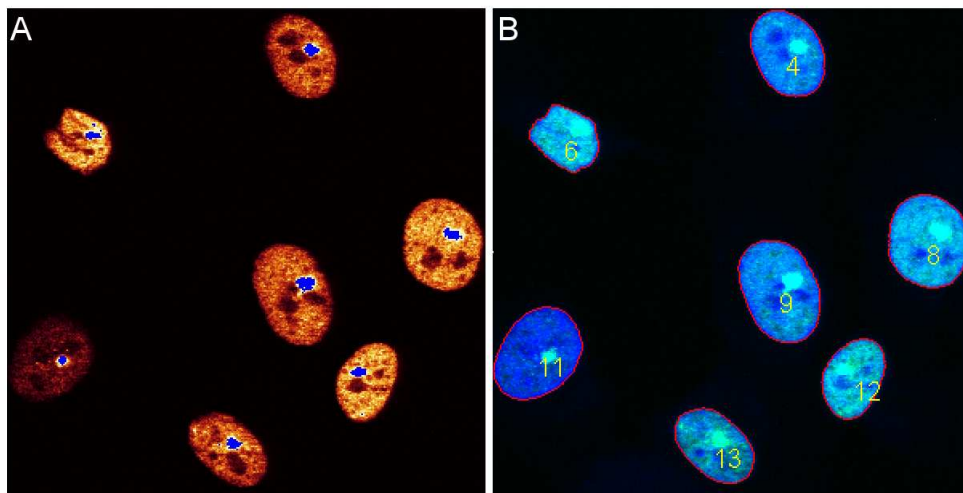
Zur Detektion apoptotischer Zellen wurde der Annexin-V-FLUOR-Kit von Roche verwendet. Dabei wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen kurz mit PBS gespült und Färbelösung mit Fluorescein-gekoppeltem Annexin, Hoechst und PI entsprechend den Angaben des Herstellers hergestellt. Die Zellen wurden für 15 min im Dunkeln gefärbt. Nach zweimaligem Waschen mit PBS für jeweils 3 min erfolgte für 10 min die Fixierung der Zellen in 4 % PFA in PBS. Die Zellen wurden zweimal 3 min mit PBS gewaschen und mit einem Tropfen Einbettmedium eingedeckelt. Bis zur Mikroskopie wurden die Proben im Dunkeln bei 4 °C gelagert. Für die Färbung von nicht adhären wachsenden Lymphocyten wurden diese nach jedem Schritt für 10 min bei 110 g und 4 °C zentrifugiert. Nach der Annexin-Färbung wurden die Zellen für die Mikroskopie auf einem Objektträger fixiert. Dazu wurden 50 µl der Suspension aus gefärbten Zellen in ein Mikrogefäß mit Bodenöffnung (0,5 mm) pipettiert und dieses in eine Probenhalterung (Zytocontainer mit Gefäßträger) gesetzt. Unter die Halterung wurde ein Objektträger gelegt und die Halterung in der Zentrifuge befestigt. Die Zellsuspension wurde für 10 min bei 300 g auf den Objektträger zentrifugiert.

### 3.1.7 Konfokale Mikroskopie

Die Aufnahmen von fluoreszenzgefärbten Zellen erfolgte am konfokalen Laserscanning-Mikroskop (DM IRBE/TCS NT, Leica) mit einem 63x Objektiv (Plan Apo 63x/1,32, Ölimmersion). Mit einem Argon-Krypton-Laser konnte mit den Wellenlängen 488 nm, 568 nm und 647 nm angeregt werden. Es war außerdem möglich, für Intensitätsbestimmungen (vergleiche Kapitel 3.1.8) das Transmissionslicht während der Aufnahmen zu messen. Die Intensität des Lasers (Stärke der Anregung), die Sensitivität der Photomultiplier (Verstärkung des detektierten Signals) und der Offset (setzt die Schwelle fest, ab der geringe Intensitäten = 0 bzw. > 0 gesetzt werden) wurden so gewählt, dass die Fluoreszenzsignale nicht in Sättigung waren. Dies konnte mit der Aufnahmesoftware Leica TCS

mit der Funktion *GlowOver* überprüft werden, die gesättigte Signale farblich markiert (Abb. 11 A). Für die Intensitätsmessung kernweiter Fluoreszenzsignale hingegen wurden die Einstellungen so gewählt, dass die Signale der Foci in Sättigung waren (vergleiche Kapitel 3.1.8). Der gesamte Zellkern wurde in z-Richtung (in der Tiefe) in mehreren Ebenen aufgenommen. Bei Fibroblasten wurde ein Abstand von 0,243  $\mu\text{m}$  zwischen den Ebenen gewählt, bei anderen Zelllinien aufgrund der weniger starken Abflachung der Zellkerne 0,365  $\mu\text{m}$ . Jede Ebene wurde zweimal aufgenommen und ein Mittelwert aus beiden Aufnahmen gebildet, um eine genauere Aufnahme zu erhalten.

Für Aufnahmen von fluoreszenzgefärbten Zellen mit Hoechst-Kernfärbung (bei Annexin-Färbung) wurde ein konfokales Spinning Disk Mikroskop von Nikon (Eclipse Ti mit EMCCD Kamera von Andor) verwendet, da hier durch den Laser (Andor Laser Combiner) neben den Wellenlängen 488 nm, 561 nm, 647 nm, auch mit der Wellenlänge von 405 nm angeregt werden konnte. Es wurde ein 60x Objektiv (Plan Apo 60x/1,40, Ölimmersion) verwendet. Der Abstand der aufgenommenen Ebenen in z-Richtung betrug 0,3  $\mu\text{m}$ . Auch hier wurden die Laserintensität und die Expositionszeit so gewählt, dass die Fluoreszenzsignale nicht in Sättigung waren, was mit der Aufnahmesoftware Andor iQ überprüft wurde.



**Abbildung 11: Darstellung gesättigter Intensitäten und automatische Zellkernerkennung.** A zeigt das  $\gamma\text{H2AX}$ -Signal von humanen Fibroblasten eine Stunde nach Bestrahlung mit 2 Goldionen (12800 keV/ $\mu\text{m}$ ) in einen Punkt an der Mikrosonde in einer Bildebene. Gesättigte Intensitäten sind durch das Programm Leica TCS (Funktion *GlowOver*) in blau, hohe Intensitäten in weiß und schwächere Intensitäten in rot dargestellt. (B) Durch eine benutzerdefinierte Version von Image-pro Plus wurden die Zellkerne anhand der ToPro-3-Färbung (blau dargestellt) erkannt. Die Zellkerne werden für jedes Bild nummeriert und für jeden Zellkern die Intensität des  $\gamma\text{H2AX}$ -Signals (grün) jedes Pixels ausgegeben.

### 3.1.8 Intensitätsmessung kernweiter Fluoreszenzsignale

Die automatische Bestimmung der Fluoreszenzintensität des kernweiten  $\gamma\text{H2AX}$ -Signals erfolgte anhand von Aufnahmen mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop (Leica TCS). Für diese Aufnahmen wurden die Einstellungen (vergleiche Kapitel 3.1.7) so gewählt, dass sich die  $\gamma\text{H2AX}$ -Schadensfoci in Sättigung befanden. Für die Quantifizierung von  $\gamma\text{H2AX}$  wurde dieses immer mit dem sekundären Alexa-488-gekoppelten Antikörper gefärbt, der bei der Wellenlänge 488 nm angeregt wird (eine Ausnahme stellt der Versuch mit CENP-F-Färbung dar, siehe Abb. 20). Die Intensitäten der Anregungswellenlängen wurden so eingestellt, dass der Laser bei 488 nm deutlich stärker

(ca. dreimal so stark) war wie bei der Wellenlänge für die Anregung der Kernfärbung. Dadurch sollte sicher gestellt werden, dass sich eventuelle geringe Schwankungen in der Laserintensität hauptsächlich auf das  $\gamma$ H2AX-Signal auswirken, da später das  $\gamma$ H2AX-Signal durch Normierung auf die Laserintensität, die parallel zur Aufnahme gemessen wurde, wieder korrigiert wurde. Es wurde jeweils überprüft, dass bei einem Wert für das Transmissionslicht nahe null auch ein  $\gamma$ H2AX-Wert nahe null gemessen wurde, dass also durch die Einstellungen kein künstlicher Offset erzeugt wurde, der die Intensitätswerte bei einer Normierung auf das Transmissionslicht fehlerhaft beeinflussen würde.

Mit Hilfe einer benutzerdefinierten Softwareversion von Image-Pro Plus wurden Maximumprojektionen der Aufnahmen erstellt und die Zellkerne automatisch anhand der Pixel erkannt, die positiv für die DNA-Färbung (ToPro-3 oder PI) waren (Abb. 11 B). Innerhalb der als Zellkerne erkannten Bereiche wurde für jeden Pixel die Intensität des  $\gamma$ H2AX-Signals ausgegeben. So kann für jeden Zellkern ein Intensitätsprofil erstellt werden, um zu beschreiben, wieviele Pixel welche Intensität aufwiesen (vergleiche Kapitel 4.1.5). Die höchste Intensität dieses Profils beinhaltet die in Sättigung befindlichen Pixel der  $\gamma$ H2AX-Foci. Diese Intensität wurde für die weitere Auswertung nicht berücksichtigt. Die Pixel der Foci gehen aber immer noch zu einem kleinen Anteil in das Intensitätsprofil mit ein, da sich am Rand der Foci Pixel mit hoher, aber nicht gesättigter Intensität befinden. Der häufigste Intensitätswert des Intensitätsprofils wird weniger durch diese Pixel beeinflusst als der Mittelwert oder Median (vergleiche Meyer et al. (2010) und Kapitel 4.1.5), doch es ergibt sich für diesen Wert eine zufällige Streuung in den Intensitätsprofilen der einzelnen Zellkerne. Die erhaltenen Intensitätswerte bei Bildung des Mittelwertes, des Medians und der häufigsten Intensität einer Probe unterscheiden sich jedoch nicht stark (vergleiche Kapitel 4.1.5). Deshalb wurde der Mittelwert der Intensitäten eines Zellkerns als repräsentativer Wert für das kernweite Fluoreszenzsignal verwendet. Wie bereits erwähnt erfolgte außerdem eine Normierung der Intensitäten auf das Transmissionslicht, um den Einfluss einer möglichen geringen Schwankung der Laserintensität während der Aufnahmen auf die Auswertung auszuschließen. Für jede Probe wurden die Signale von ungefähr 50 bis 250 Zellen gemessen und der Mittelwert der mittleren Intensitäten jedes untersuchten Zellkerns berechnet. Die Ausgabe der Intensitäten anhand der Laserscanning-Mikrographen, sowie die Ermittlung der Mittelwerte, Mediane und häufigsten Intensitäten der Zellkerne mit Hilfe der benutzerdefinierten Software wurde freundlicherweise von Dr. Kay-Obbe Voss durchgeführt.

### 3.1.9 Bildbearbeitung mit ImageJ

Für die bildliche Darstellung von fluoreszenzgefärbten Zellen wurden mit Hilfe von ImageJ Maximumprojektionen der Mikroskopiebilder erstellt, das bedeutet, für jeden Kanal wurde an jeder Position der hellste Pixel über alle aufgenommenen Ebenen abgebildet. Es wurde außerdem ein Medianfilter verwendet, um das Rauschen des Signals zu verringern. Für die Darstellung von Fluoreszenzsignalen in Bildern wurde die Helligkeit der Signale teilweise angepasst, wobei alle Bilder eines Experiments die gleichen Einstellungen erhielten.

### 3.1.10 Normierung der gemessenen Dosis-Effekt-Kurven mittels Kurvenfit

Bei der Quantifizierung des kernweiten Immunfluoreszenzsignals wurden für jedes Experiment die Einstellungen am Mikroskop der Signalstärke von  $\gamma$ H2AX angepasst, so dass die  $\gamma$ H2AX-Foci eine gesättigte Intensität aufwiesen. Daher sind die absoluten Intensitätswerte verschiedener Experimente nicht direkt miteinander vergleichbar. Um den Kurvenverlauf der Dosis-Effekt-Kurven aus verschiedenen Strahlzeiten miteinander vergleichen zu können, sollten diese auf die gleiche Höhe normiert werden (vergleiche Kapitel 4.2.1). Da jedoch in den Experimenten mit unterschiedlichen Dosen bestrahlt wurde, lag nicht für jede Kurve ein Messpunkt bei einer gemeinsamen Dosis vor. Daher wurden für die Kurven mit folgender Gleichung die jeweiligen Fit-Parameter ( $A$ ,  $t_1$  und  $d$ ) mit der Software GraFit ermittelt, wobei  $t$  die jeweilige Dosis ist.

$$y = A \cdot (1 - e^{-t/t_1}) - d \quad (7)$$

Anhand dieses Fits wurde der theoretische Intensitätswert für alle Kurven bei 7,7 Gy ermittelt. Diese Dosis wurde gewählt, weil es sich um die höchste Dosis in der Kohlenstoffkurve handelt und der niedrigsten Dosis in der Goldkurve (8,5 Gy) am nächsten ist, es sich also um einen Übergangspunkt zwischen den verschiedenen Kurven handelt. Aus dem Quotienten der gemessenen Intensität bei Kohlenstoff (7,7 Gy) und der berechneten Intensität bei Stickstoff, Nickel und Gold (7,7 Gy) ergaben sich die Normierungsfaktoren, die zur Normierung der jeweiligen Messwerte der unterschiedlichen Strahlzeiten dienen.

### 3.1.11 Statistische Berechnungen

#### Chi-Quadrat-Test

Um zu überprüfen, ob die Häufigkeiten der gemessenen Intensitätsmittelwerte einer Probe einer Normalverteilung entsprachen, wurde der Chi-Quadrat-Test durchgeführt. Anhand dieses Tests kann untersucht werden, ob die beobachteten Messwerte ( $B_k$ ) mit den erwarteten Werten ( $E_k$ ) übereinstimmen.

$$\chi^2 = \sum_k \frac{(B_k - E_k)^2}{E_k} \quad (8)$$

Anhand des  $\chi^2$ -Wertes kann in der  $\chi^2$ -Tabelle der p-Wert abgelesen werden. Mit Hilfe der Software Microsoft Excel wurde anhand des aus den gemessenen Werten berechneten Mittelwertes einer Probe und der Standardabweichung die erwarteten Häufigkeiten bei einer Normalverteilung berechnet. Der Vergleich zwischen den gemessenen und den erwarteten Werten erfolgte ebenfalls mit Hilfe von Microsoft Excel.

#### Mann-Whitney-Test

Der Mann-Whitney-Test oder U-Test ist ein Rangtest, bei dem alle Werte zweier Proben der Größe nach in einer gemeinsamen Reihe angeordnet werden. Jedem Wert wird entsprechend seiner Position in dieser Reihe eine Rangzahl zugeordnet. Für beide Proben wird dann die Summe der Rangzahlen aller Werte der jeweiligen Probe berechnet ( $R_1$  und  $R_2$ ). Anschließend erfolgt die Er-

mittlung des U-Wertes anhand der R-Werte und des Stichprobenumfangs ( $n_1$  und  $n_2$ ).

$$U_1 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_1 \cdot (n_1 + 1)}{2} - R_1 \quad (9)$$

$$U_2 = n_1 \cdot n_2 + \frac{n_2 \cdot (n_2 + 1)}{2} - R_2 \quad (10)$$

Mit Hilfe der U-Werte kann anhand der U-Tabelle der p-Wert bei einem Stichprobenumfang bis zu 20 abgelesen werden. Die Berechnung der p-Werte bei zweiseitigem Test erfolgte mit Hilfe der Website: <http://faculty.vassar.edu/lowry/utest.html>

### 3.1.12 Biochemische Methoden

#### 3.1.12.1 Präparation von Gesamtzelllysaten

Für die Herstellung von Gesamtzelllysaten wurden die Zellen in Ø 3,2 cm Petrischalen kultiviert. Die Lyse der Zellen erfolgte auf Eis. Dazu wurde das Kulturmedium verworfen, die Zellen kurz mit PBS gespült und anschließend nach Zugabe von 70 µl SDS-Lysepuffer mit einem Zellschaber abgekratzt. Die Lösung wurde in ein 1,5 ml Eppendorf-Gefäß überführt und mit Hilfe einer Spritze 10-mal durch eine 25G Kanüle gezogen. Nach 10-minütigem Aufkochen bei 100 °C wurde das Lysat für 10 min bei 13 000 g und 4 °C zentrifugiert. Der proteinhaltige Übersand wurde abgenommen und bei -20 °C gelagert.

#### 3.1.12.2 Subzelluläre Proteinfractionierung

Ziel dieser Zellysemethode ist die schrittweise Permeabilisierung der Cytoplasma- und Kernmembran, so dass cytoplasmatisches, nukleoplasmatisches und an Chromatin gebundenes Protein in verschiedene Fraktionen getrennt werden kann. Das in dieser Arbeit verwendete Protokoll wurde in Anlehnung an Arva et al. (2005) und Lin et al. (2008) für Fibroblasten etabliert. Da die Chromatin-Gebundenheit von  $\gamma$ H2AX überprüft werden sollte, wurden besonders stringente Bedingungen für die Auftrennung von Nukleoplasma- und Chromatinfraction gewählt, so dass auch locker an das Chromatin gebundenes Protein in der Nukleoplasmafraction enthalten war.

Für die Proteinfractionierung wurden Fibroblasten aus 10 Petrischalen (Ø 3,2 cm) gepoolt. Dazu wurde das Medium aus den Zellgefäßen gesammelt und die unbestrahlten Zellen, die sich am unteren Rand der Petrischale bei senkrechter Bestrahlung befanden, mit einem Wattestäbchen entfernt, da diese durch den sich sammelnden Mediumtropfen nicht bestrahlt waren. Die Zellen wurden kurz mit PBS gewaschen und mit 0,5 ml Trypsin-EDTA-Lösung für 5 min im Brutschrank abgelöst. Für eine vollständige Ablösung der Zellen wurde zusätzlich ein Zellschaber verwendet. Das Vereinzeln der Zellen erfolgte durch 4-maliges Auf- und Abpipettieren der Zellen in den Petrischalen. Die Aktivität des Trypsins wurde durch Zugabe des aufbewahrten Mediums gestoppt. Die Zellsuspensionen aller Zellgefäße wurden gepoolt und für 10 min mit 110 g und 4 °C abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 450 µl CSK-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 50 µl 10 % Triton X-100 in Wasser eine Endkonzentration von 1 % Triton X-100 erreicht. Die Zellsuspension wurde kurz gevortext und 26 min auf Eis inkubiert.

Die Fraction cytoplasmatischer Proteine wurde anschließend durch Zentrifugation für 5 min mit 1000

g bei 4 °C von den Zellkernen getrennt. Die Zellkerne wurden mit CSK-Puffer gewaschen und erneut zentrifugiert. Das Zellkernpellet wurde in 500 µl Arva-Puffer C resuspendiert, die Zellkernsuspension 25-mal durch eine 27G Kanüle gezogen und für 1 h auf Eis inkubiert, wobei die Suspension immer wieder durch Vortexen und Auf- und Abpipettieren gemischt wurde. Die Suspension wurde 1 min und 10 sec im Ultraschallbad (Bioruptor UCD-200, diagenode) bei niedriger Intensität (power level L) behandelt und für 1 h und 40 min weiter auf Eis inkubiert. Das Abtrennen der Nukleoplasmafraktion erfolgte durch Zentrifugation für 30 min mit 13 000 g und 4 °C. Das Chromatinpellet wurde in 150 µl SDS-Lysepuffer für 15 min bei 95 °C gelöst. Die Proteinlysate wurden bei -20 °C gelagert.

### 3.1.12.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinlösungen

Diese Nachweismethode nach Lowry et al. (1951) wurde mit dem D<sub>c</sub> Protein Assay Kit von Bio-Rad nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Absorption des entstehenden Farbstoffes wurde bei 690 nm gemessen. Bei jeder Messung wurde parallel eine Eichgerade erstellt, indem die Absorption bekannter steigender BSA-Konzentrationen mitgemessen wurde (0, 0,2, 0,4, 0,8 und 1 mg/ml). Die Absorptionsmessung am ELISA-Reader und die Berechnung der Konzentration anhand der Eichgerade erfolgte mit Hilfe der Software Gen5.

### 3.1.12.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese und Western Blot

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wurde mit 5-prozentigen (bei Nachweis von 53BP1) bis 15-prozentigen (bei Nachweis von γH2AX) selbst gegossenen Polyacrylamidgelen durchgeführt. Die Zusammensetzung von Lauf- und Trenngelpuffer erfolgte jeweils nach Sambrook et al. (1989). Es wurden 20 µg Proteinlysate mit 2-fach konzentriertem SDS-Probenpuffer im Verhältnis 2:1 versetzt und für 3 min bei 95 °C aufgekocht. Das Gel wurde in der PAGE-Apparatur (Bio-Rad) befestigt und die innere und äußere Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Das aufgekochte Proteinlysate, sowie 4 µl des Proteinstandards PageRuler PreStained Plus (Fermentas) wurden in die Taschen des Gels pipettiert. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 45 mA/Gel für 30 bis 45 min.

Das Blotting der Proteine auf eine PVDF-Membran (Polyvinylidenfluorid-Membran) erfolgte in einer mit Wasser angefeuchteten *Semidry*-Blottingapparatur (Hoefer). Die PVDF-Membran wurde durch kurzes Tränken in Methanol hydrophil gemacht und anschließend kurz in Transferpuffer geschwenkt. Das Sammelgel wurde vom Trenngel entfernt und das Trenngel auf zwei in Transferpuffer getränkte Whatman-Papiere gelegt. Die Membran wurde auf die andere Seite des Gels gelegt und zwei weitere in Transferpuffer angefeuchtete Whatman-Papiere wurden auf die Membran gelegt. Dieser Stapel wurde in die *Semidry*-Blottingapparatur so gelegt, dass das Gel auf der Seite des Minuspols und die Membran auf der Seite des Pluspols lag. Möglicherweise vorhandene Luftblasen wurden durch Rollen eines Reagenzglases über das Whatmanpapier entfernt. Der Proteintransfer erfolgte bei 65 mA/Gel für 45 min.

Für den gleichzeitigen Nachweis von Proteinen mit hoher Masse (DNA-PK 460 kDa, ATM 350 kDa und ATR 300 kDa) und Proteinen mit niedrigerer Masse (Aktin und Tubulin ungefähr bei 40 und 50 kDa) auf einem Gradientengel wurden 3- bis 8-prozentige Tris-Acetat-Gele (Invitrogen) verwendet. Es wurden 10 µl der Proteinprobe aufgetragen. Dazu wurde 20 µg Proteinlysate mit 1 µl 50 % β-Mercaptoethanol und 2,5 µl 4-fachem LDS-Probenpuffer versetzt und mit Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Die Proben wurden für 10 min bei 70 °C aufgekocht. Die äußere Kammer der PAGE-Apparatur

(Invitrogen) wurde mit Laufpuffer und die innere Kammer mit 200 ml Laufpuffer und 500 µl Antioxidant gefüllt. Als Proteinstandard wurden 8 µl des Proteinstandards HiMark (Invitrogen) verwendet. Die Auftrennung der Proteine erfolgte bei 150 V für 1 h 10 min.

Der Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte in einer Tank-Blot-Apparatur (Invitrogen) mit 250 ml Transferpuffer und 250 µl Antioxidant. Dazu wurden die Taschen des Gels entfernt und die Membran, nachdem sie kurz in Methanol und Transferpuffer geschwenkt wurde, auf das Gel gelegt. Unter das Gel und über die Membran wurden jeweils zwei in Transferpuffer angefeuchtete Whatman-Papiere gelegt. Außerhalb der Whatman-Papiere wurden je zwei in Transferpuffer getränkte Schwämme gelegt. Der Stapel wurde zwischen Minus- und Pluspol gelegt und die entstandene Kammer mit Transferpuffer gefüllt. Die äußere Kammer wurde zur Kühlung mit Eiswasser gefüllt. Der Transfer der Proteine erfolgte bei 30 V für 1 h 10 min.

### 3.1.12.5 Immunologischer Nachweis der Proteine

Zunächst wurden unspezifische Bindungsstellen auf der Membran durch Inkubation mit 5 % Milchpulver in TBS-T für 30 min bei RT abgesättigt. Es folgte die einstündige Inkubation der Membran mit dem Erstantikörper in 5 % Milchpulver in TBS-T (Verdünnung entsprechend Kapitel 3.2.4 Tabelle 3). Die Verdünnung des Erstantikörpers und die Blockierung der Membran erfolgte bei Verwendung des anti-ATR-Antikörpers aus Ziege mit 5 % BSA in TBS-T. Nach 3-maligen Waschen in TBS-T für 5 min wurde die Membran für 1 h mit in TBS-T verdünntem HRP-gekoppeltem (*horse radish peroxidase*) Antikörper inkubiert (Verdünnung entsprechend Kapitel 3.2.4 Tabelle 4). Es wurde erneut 4-mal für 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Membran wurde für 5 min im Dunkeln mit einer frisch angesetzten Mischung aus ECL Plus Lösung A und B (40:1) inkubiert. HRP verwendet  $H_2O_2$ , um sein Substrat Luminol zu oxidieren. Oxidiertes Luminol zerfällt anschließend, wobei Licht emittiert wird. Die Lichtemission wird durch Auflegen eines Fotofilms im Dunkeln detektiert. Die Expositionsdauer des Films wurde je nach Signalstärke variiert und lag zwischen 10 sec und 10 min. Die automatische Entwicklung des Films erfolgte in einer Entwicklertasche (AGFA) mit den zugehörigen Entwickler- und Fixierlösungen.

### 3.1.12.6 Strippen der Membran für erneute Immundetektion

Um Antikörper, die an das Protein auf der PVDF-Membran gebunden waren, für eine erneute Immundetektion zu entfernen, wurde die Membran 30 min mit Stripping-Puffer inkubiert. Das geschah in einem geschlossenen Behälter unter Schütteln in einem auf 50 °C erwärmten Wasserbad. Anschließend wurde die Membran 4-mal für 5 min mit TBS-T unter Schütteln gewaschen und weiter wie unter Abschnitt 3.1.12.5 verfahren.

## 3.2 Materialien

### 3.2.1 Zelllinien

#### AA8: Hamster Zellen

Es handelt sich um ovariäre Zellen aus Chinese Hamster (American Type Culture Collection), abgeleitet vom Parentalstamm CHO-K1. Diese Zelllinie wurde freundlicherweise von Prof. M. Lavin aus Brisbane zur Verfügung gestellt. Die Zellen wurden in RPMI mit 10 % FCS kultiviert und mit 0,05 %

Trypsin/0,1 % EDTA trypsiniert.

#### **AG1522: normale humane Fibroblasten**

Bei AG1522 Zellen handelt es sich um humane Hautfibroblasten bezogen vom Coriell Institute for Medical Research. Dieser Zelltyp wächst kontaktinhibiert, das bedeutet, die Zellen stellen ihre Teilungsaktivität beim Erreichen der Konfluenz ein. Die Kultivierung der Zellen erfolgte in EMEM Medium mit 15 % FCS, 1 % Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Für das Ablösen wurde 0,05 % Trypsin/0,1 % EDTA verwendet. Es handelt sich um eine primäre Zelllinie, die bei zunehmender Verdopplungszahl ausdifferenziert. Da dies zu einer Veränderung der Genexpression führen kann, wodurch die Ergebnisse der Experimente beeinflusst werden könnten, wurde die Verdopplungszahl der Zellen bei der Kultivierung dokumentiert. Die CPD (*cumulative population doublings*) wurde bei jeder Passage wie folgt berechnet:

$$CPD_{alt} + \frac{\ln(N_{Ernte}/N_{Einsaat} \cdot AE)}{\ln 2} \quad (11)$$

N = Anzahl Zellen, AE = Anheftungseffizienz

Die Zellen wurden von CPD 18 bis CPD 31 für Experimente verwendet.

#### **AT1BR: ATM-defiziente humane Fibroblasten**

Diese humanen Fibroblasten (European Collection of Animal Cell Cultures) stammen von einem Ataxia-Telangiectasia-Patienten. Bei dieser Zelllinie kommt es durch eine 9 Nukleotide lange Insertion in beiden Allelen des ATM-Gens zur Bildung eines verkürzten ATM-Proteins. Das Fragment besteht nur aus 753 Aminosäuren anstatt 3056 (Stankovic et al. (1998), Patient 92-3). Als WT-Kontrolle dienten AG1522 Zellen. Die AT1BR Zellen wurden in Ham's F10 mit 15 % FCS kultiviert und mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA geernet.

#### **humane Lymphocyten**

Humane nicht adhärent wachsende Lymphocyten wurden für die Positiv-Kontrolle des Apoptose-Nachweises mittels Annexin-Färbung verwendet. Eine Probe dieser Zellen wurde von Jonas Klinger (Arbeitsgruppe Dr. Claudia Fournier an der GSI) freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die Zellen stammen vom Blutspendedienst des DRK (Deutsches Rotes Kreuz), Frankfurt am Main.

#### **MEF DNA-PK WT und DNA-PK-defizient**

Diese embryonalen Mausfibroblasten (MEF) wurden aus WT Mäusen bzw. aus DNA-PK-defizienten Mäusen gewonnen, bei denen das DNA-PKcs-Gen durch homologe Rekombination mutiert wurde. Dabei wurde ein Teil von Exon 3 und Intron 3 des DNA-PKcs-Gens durch ein PGK-neo-Genkonstrukt ersetzt, wodurch die Synthese einer funktionellen DNA-PKcs verhindert wird (Kurimasa et al., 1999). Es fand eine spontane Immortalisierung der Zellen statt (Tomimatsu et al., 2007). Die Zellen wurden in Alpha-Medium mit Nukleosiden und 10 % FCS kultiviert. Für das Trypsinieren wurde 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA verwendet. Prof. G. Iliakis aus Essen stellte diese Zelllinien freundlicherweise zur Verfügung.



**MEF H2AX WT und -/-**

Es handelt sich um WT und H2AX -/- embryonale Mausfibroblasten. Bei H2AX -/- Mäusen wurde in das H2AX-Gen eine Neomycin-Resistenz-Kassette integriert und so eine Nullmutation erzeugt (Petersen et al., 2001). Die Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurde 0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA verwendet.

**MEF MDC1 WT und -/-**

Es handelt sich um WT oder MDC1 -/- embryonale Mausfibroblasten (Becherel et al., 2010). Die Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 10 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Zum Ablösen der Zellen wurde 0,05 % Trypsin/ 0,02 % EDTA verwendet. Die Zelllinien wurden freundlicherweise von Prof. M. Lavin aus Brisbane zur Verfügung gestellt.

**U2OS**

Diese Osteosarkom-Zelllinie wurde von der American Type Culture Collection bezogen. Die Kultivierung erfolgte in DMEM mit 4,5 g/l Glukose mit 10 % FCS. Die Zellen wurden durch Inkubation mit 0,05 % Trypsin/0,1 % EDTA vom Zellgefäß abgelöst.

**NFFhTert**

Diese normalen humanen Hautfibroblasten (NFF *normal foreskin fibroblasts*), die mit humaner Telomerase Reverse Transkriptase (hTert) transfiziert sind, wurden freundlicherweise von Prof. M. Lavin aus Brisbane zur Verfügung gestellt. Die Immortalisierung erfolgte nach dem Protokoll nach Toouli et al. (2002). Die Zellen wurden in DMEM mit 4,5 g/l Glukose, 15 % FCS, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin kultiviert. Das Ablösen erfolgte mit 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA.

**XPA-Zellen**

Diese humanen Fibroblasten stammen von einem Patienten mit schweren Symptomen der Krankheit Xeroderma Pigmentosum. Die Zellen besitzen einen homozygoten Defekt im Gen für das Protein XPA. Dabei kommt es durch eine Punktmutation im Codon für Arginin (CGA) an Position 207 in Exon 5 zur Entstehung eines Stop-Codons (TGA) und damit zur Expression eines verkürzten Proteins (Satokata et al., 1992). Die Zelllinie wurde bezogen vom Coriell Institute for Medical Research (NIGMS Nr. GM00710). Die Kultivierung erfolgte in EMEM, 15 % FCS, 1 % Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin. Zum Ablösen der Zellen wurde 0,05 % Trypsin/0,02 % EDTA verwendet.

### 3.2.2 Zellkulturmedien und -zusätze

Lösung	Hersteller
Accutase	PAA Laboratories
Alpha-Medium mit Nukleosiden	Biochrom
DMEM	Biochrom
EMEM mit EBSS	Lonza
FCS	Biochrom
Ham's F10 Medium	Biochrom
Hepes (1M)	Biochrom
L-Alanyl-L-Glutamin	Biochrom
OptiMEM	GIBCO
PBS aus Trockensubstanz	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (10000 U/ml / 10000 µg/ml)	Biochrom
RPMI	Biochrom
Trypsin/EDTA	PAN Biotech

### 3.2.3 siRNA

Alle siRNAs wurden von Dharmacon bezogen und mit RNase freiem Wasser gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte mit Hilfe des Photometers und die Lagerung bei - 80 °C. Zur Kontrolle wurde unspezifische Negativ-Kontroll-siRNA (Referenz: SR-CL000-005) von Eurogentec S. A. in der gleichen Konzentration und mit der gleichen Inkubationszeit wie die jeweils verwendete spezifische siRNA eingesetzt.

Ziel-RNA	Sequenz	Endkonzentration	Inkubationszeit	Referenz
ATM	5' CAUCUAGAUCGGCAUUCAG 3'	20 nM	72 h	Boehme et al. (2008)
ATR	5' GGCACUAAUUGUUCUCAA 3'	20 nM	72 h	Boehme et al. (2008)
CtIP	5' GCUAAAACAGGAACGAAUC 3'	10 nM	48 h	Sartori et al. (2007)
DNA-PKcs	5' GAUCGCACCUUACUCUGUUUU 3'	20 nM	72 h	Boehme et al. (2008)
Mre11	5' GGAGGUACGUCGUUUCAGA 3'	10 nM	48 h	Yuan und Chen (2010)

Tabelle 2: Verwendete siRNAs

### 3.2.4 Antikörper

Im Folgenden sind die in dieser Arbeit für Immunfluoreszenzfärbung (IF) und Western Blot Analyse (WB) verwendeten Antikörper aufgelistet.

Antigen (Nummer/Klon)	Spezies	Bezugsquelle	Verdünnung
53BP1 (ab36823)	Kaninchen	Abcam	1:2000 (WB)
53BP1 (Ab-1)	Kaninchen	Calbiochem	1:500 (IF)
Aktin (20-33)	Kaninchen	Sigma	1:5000 (WB)
ATM (clone Y170)	Kaninchen	Millipore	1:4000 (WB)
ATM, pospho-S1981 (clone 10H11.E12)	Maus	Rockland	1:500 (IF), 1:2000 (WB)
ATR (N-19)	Ziege	Santa Cruz	1:500 (WB)
CENP-F (ab5)	Kaninchen	Abcam	1:500 (IF)
CtlP (A300-488A)	Kaninchen	Bethyl Laboratories	1:1000 (WB)
DNA-PKcs (Ab-4)	Maus	Lab Vision	1:5000 (WB)
DNA-PKcs, phospho-S2056 (ab18192)	Kaninchen	Abcam	1:100 (IF), 1:1000 (WB)
$\gamma$ H2AX (07-164)	Kaninchen	Millipore	1:200 (IF)
$\gamma$ H2AX (JBW301)	Maus	Millipore	1:500 (IF), 1:2000 (WB)
Histon H4, acetyl-K5/8/12/16 (06-866)	Kaninchen	Upstate	1:1000 (WB)
MDC1	Schaf	zur Verfügung gestellt von Prof. M. Lavin, Brisbane	1:400 (IF)
Mre11 (ab214)	Maus	Abcam	1:1000 (WB)
Mre11, phospho-S676/678	Kaninchen	zur Verfügung gestellt von Prof. M. Lavin, Brisbane	1:100 (IF)
NBS1, phospho-S343 (3001)	Kaninchen	Cell Signaling Technology	1:50 (IF)
RPA32, phospho-S4/S8 (A300-254A)	Kaninchen	Bethyl Laboratories	1:200 (IF)
Tubulin (clone B-5-1-2)	Maus	Sigma	1:50000 (WB)

Tabelle 3: Primärantikörper

Konjugat	Antigen	Spezies	Bezugsquelle	Nummer	Verdünnung
Alexa-488	Kaninchen-IgG	Ziege	Molecular Probes	A11070	1:400
Alexa-488	Maus-IgG	Ziege	Molecular Probes	A11017	1:400
Alexa-568	Kaninchen-IgG	Ziege	Molecular Probes	A21069	1:400
Alexa-568	Maus-IgG	Ziege	Molecular Probes	A11019	1:400
Alexa-568	Schaf-IgG	Esel	Molecular Probes	A21099	1:400
HRP	Kaninchen-IgG	Esel	Amersham Biosciences	NA934	1:10000
HRP	Maus-IgG	Schaf	Amersham Biosciences	NXA931	1:10000
HRP	Ziege-IgG	Maus	Santa Cruz	N19	1:20000

Tabelle 4: Sekundärantikörper

### 3.2.5 Puffer und Lösungen

#### Arva-Puffer C

20 mM Hepes (pH 7,9), 25 % (v/v) Glycerol, 420 mM Natriumchlorid, 1,5 mM Magnesiumchlorid, 0,2 mM EDTA

Zugabe direkt vor Gebrauch: 1x Proteaseinhibitor-Cocktail, 10 mM NaF, 500 µM AEBSF, 1 mM DTT

#### Cell-TAK

Cell Tak wurde in 0,1 M Natriumbicarbonat (pH 8, steril) gelöst (1,38 µg/100 µl) und innerhalb von 10 min verarbeitet

#### CSK-Puffer

10 mM PIPES (pH 7), 100 mM Natriumchlorid, 300 mM Saccharose, 3 mM Magnesiumchlorid

Zugabe direkt vor Gebrauch: 1x Proteaseinhibitor-Cocktail, 10 mM Natriumfluorid, 500 µM AEBSF, 1 mM DTT

#### Cytoskeleton Puffer

10 mM PIPES (pH 6,8), 100 mM Natriumchlorid, 300 mM Saccharose, 3 mM Magnesiumchlorid, 1 mM EGTA, 0,5 % (v/v) Triton X-100

#### Cytoskeleton Stripping Puffer

10 mM Tris HCl, 10 mM Natriumchlorid, 3 mM Magnesiumchlorid, 1 % Tween, 0,5 % (w/v) Natrium-Deoxycholat, pH 7,4 mit Natriumhydroxid eingestellt

#### Laufpuffer für PAA-Gele ohne Gradient

25 mM Tris Base, 192 mM Glycin, 0.1 % (w/v) SDS

#### Laufpuffer für Gradientengele

50 mM Tricin, 50 mM Tris Base, 0,1 % (w/v) SDS

#### Methylenblaulösung

30 % (v/v) Löffler's Methylenblaulösung, 5 % (v/v) Methanol, 0,009 % (v/v) Kaliumhydroxid

### **Modified Streck Tissue Fixative**

150 mM 2-Bromo-2-nitro-1,3-propandiol, 108 mM Diazolidinylurea, 10 mM Tri-Natriumcitrat-Dihydrat, 50 mM EDTA

### **PBS**

137 mM Natriumchlorid, 7,9 mM Dinatriumhydrogenphosphat, 2,7 mM Kaliumchlorid, 1,5 mM Kaliumdihydrogenphosphat

### **Ribonuklease-freies Wasser**

1 ml DMPC in 99 ml 50 % Ethanol gelöst, auf 1l Wasser aufgefüllt, Inkubation mindestens für 30 min bei RT, anschließend autoklaviert

### **Sammelgelpuffer**

Für 2 Gele: 3,4 ml Wasser, 830 µl 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 630 µl 1M Tris (pH 6,8), 50 µl 10 % SDS, 50 µl 10 % APS, 5 µl TEMED

### **SDS-Lysepuffer**

100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 2 % (w/v) SDS, 20 % (v/v) Glycerol

### **SDS-Probenpuffer 2-fach konzentriert**

100 mM Tris-HCl (pH 6,8), 50 % (v/v) Glycerol, 4 % (w/v) SDS, 0,2 % (w/v) Bromphenolblau, 10 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

### **Stripping-Puffer**

2 % (w/v) SDS, 60 mM Tris HCl (pH 6,7), 0,7 % (v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol

### **TBS-T**

20 mM Tris Base, 137 mM Natriumchlorid, 0,1 % Tween

### **Transferpuffer bei Semi-dry-Transfer**

19,2 mM Glycin, 25 mM Tris Base, 0,037 % (w/v) SDS

### **Transferpuffer bei Tankblot**

25 mM Bicin, 25 mM Bis-Tris, 1 mM EDTA

### **Trenngelpuffer**

Acrylamid-Anteil im Puffer:

5 % bei Nachweis von 53BP1, 8 % bei Nachweis von CtIP und Mre11, 15 % bei Nachweis von  $\gamma$ H2AX und acetyliertem H4

Für 2 Gele (5 %): 8,4 ml Wasser, 2,5 ml 30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1), 3,8 ml 1,5 M Tris

(pH 8,8), 150 µl 10 % SDS, 150 µl 10 % APS, 12 µl TEMED

Für 8 % und 15 % wurden die Puffer entsprechend Sambrook et al. (1989) angesetzt.

### 3.2.6 Chemikalien, Materialien und Geräte

Materialien	Hersteller
Annexin-V-FLUOR-Kit	Roche
Chemolumineszenzfilm Hyperfilm ECL	GE Healthcare
D <sub>c</sub> Protein Assay Kit	Bio-Rad
Deckgläser 18 mm · 18 mm	IDL
Deckgläser 24 mm · 24mm	Roth
Deckgläser rund, Ø 7 mm, Ø 10 mm	Thermo
Deckgläser rund, Ø 30 mm	VWR
Einmalhandschuhe (Latex)	Roth
Einmalhandschuhe (Nitril)	UNIGLOVES
Einwegspritzen 1 ml	Terumo
Einwegspritzen 20 ml	Braun
Gefäßträger	Heraeus
Glaspipetten	Hirschmann
Glaswaren	Schott Duran
Gradientengele (Tris-Acetat, 3-8 %)	Invitrogen
Kanülen 25G, 27G	Terumo; Braun
Kryoröhrchen, 2ml	greiner
Küvetten UVette	eppendorf
Mehrkanalpipette Titertek Plus	ICN Flow
Mikrogefäße 0,75 ml	Heraeus
Mikrotiterplatte EL808	BioTek
Multipipette HandyStep	Brand
Mylarfolie	Goodfellow
Objektträger	VWR
Pasteurpipetten	VWR
Petrischalen Ø 3,2 cm	Nunc
Petrischalen Ø 14,5 cm	greiner
Plastikpipetten	TPP
Pipette 2 µl	Gilson
Pipette 10 - 5000 µl	Eppendorf
Pipettenspitzen	Brand; Eppendorf
PVDF-Membran	Millipore

Reaktionsgefäße 0,5 ml - 1,5 ml	Eppendorf
Spritzen-/Kanülenfilter (0,22 µm)	TPP
Whatmanpapier	Schleicher und Schüll
Zellkulturflaschen	BD Falcon
Zellschaber	TPP
Zentrifugenröhrchen 15 ml, 50 ml	TPP
Zentrifugenröhrchen 50 ml	greiner
Zytocontainer	Heraeus

<b>Chemikalien und Reagenzien</b>	<b>Bezugsquelle</b>
2-Bromo-1-nitro-1,3-propandiol	Sigma-Aldrich
30 % Acrylamid/Bisacrylamid (29:1)	Roth
AEBSF	AppliChem
Anacardsäure	Calbiochem
Antioxidant	Invitrogen
APS	Sigma
ATM-Inhibitor KU55933	Calbiochem
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich
Bicin	Sigma
Bis-Tris	AppliChem
Bromphenolblau	Serva
BSA	Roth
Cell-Tak	BD Biosciences
Diazodilinyurea	Sigma
DMPC	Sigma
DMSO	Roth
DNA-PK-Inhibitor IC86621	Calbiochem
DTT	AppliChem
ECL Plus	GE Healthcare
Einbettmedium Vectashield	Vector Laboratories
EDTA	Sigma
Entwicklerlösung (für Filmentwicklung)	AGFA
Ethanol	AppliChem
Fixierlösung (für Filmentwicklung)	AGFA
Glycerol	Sigma
Glycin	Roth
Hoechst 33342	Sigma-Aldrich
Immersionsöl nach DIN58884	Merck

Isopropanol	Roth
LDS-Probenpuffer	Invitrogen
Lipsollösung	Dynlab Crop.
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	AppliChem
Koffein	Sigma
Löffler's Methylenblaulösung	Roth
Magnesiumchlorid	Roth
Methanol 99,9 %	Roth
Milchpulver fettfrei	IGA
Mini Complete Protease Inhibitor Cocktail EDTA-frei	Roche
Natriumbicarbonat	Biochrom
Natriumchlorid	AppliChem
Natrium-Deoxycholat	Sigma
Natriumfluorid	AppliChem
Natriumazid	Sigma
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck
Paraformaldehyd	AppliChem
PIPES	Sigma
Propidiumiodid	AppliChem
Proteinstandards:	
HiMark Prestained HMW Protein	Invitrogen
PageRuler Prestained Plus	Fermentas
Ribonuklease	AppliChem
Saccharose	Merck
Salzsäure (37 %)	Merck
SDS	Sigma
TEMED	Merck
ToPro-3	Invitrogen
Transfektionsreagenzien:	
HiPerFect	Qiagen
INTERFERin	peqlab
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Trichostatin A	Cayman
Tricin	AppliChem
Tris-Base	Roth
Tris HCl	Merck
Triton X-100	Applichem



Tween Sigma-Aldrich

Geräte	Hersteller
Blottingapparaturen:	
XCell II Blot Module CE Mark (Tank-Blot)	Invitrogen
Hoefer Semiphor ( <i>semi-dry</i> )	Pharmacia Biotech
Brutschrank BBD 6220	Heraeus
Cryo Freezing Container	Nalgene
Dosimeter SN4	PTW
ELISA-Reader EL 808	BioTek
Entwicklermaschine Curix 60	AGFA
Filmkassette	rego
Heizblock 1101	peqlab
Konfokale Mikroskope	
DM IRBE/TCS NT	Leica
Eclipse Ti	Nikon
Magnetrührer Heat-Stir CB162	Stuart
PAGE-Kammern:	
Mini-Protean II	Bio-Rad
XCell Sure Lock	Invitrogen
pH-Meter 766 Calimatic	Knick
Photometer	eppendorf
Plattformschüttler UNIMAX 1010	Heidolph
Pipettierhilfe accu-jetR pro	Brand
Power Supply peqpower 300	peqlab
Reinstwasseranlage MicroPure	TKA
Röntgenröhre Isovolt DS1, Typ IV320-13	Seifert
Stereomikroskop	Carl Zeiss
Sterilwerkbänke Herasafe	Heraeus
Ultraschallbad Bioruptor UCD-200	diagenode
Waagen:	
H110	Sartorius
GS	KERN
Wasserbäder:	
mit Schüttler SW20	Julabo
ohne Schüttler	GFL
Vortexer REAX 2000	Heidolph
Zellzählgerät	Coulter

Zentrifugen:

Biofuge fresco	Heraeus
Kühlzentrifuge 3K30	Sigma
Megafuge 1.0	Heraeus
Tischzentrifuge	Fisherbrand

**3.2.7 Software**

Andor iQ 1.10.3	Andor Bioimaging Division
Gen5 1.00.14	Biotek Instruments, Inc.
GIMP 2.6.11	Spencer Kimball, Peter Mattis
GraFit 3.01	Erithacus Software Ltd.
ImageJ 1.41o	National Institutes of Health
Image-Pro Plus 6.0	Media Cybernetics, Inc.
Leica TCS NT 1.6.587	Leica Microsystems Heidelberg GmbH
Microsoft Excel 2002	Microsoft Corporation
Microsoft PowerPoint 2002	Microsoft Corporation
OriginPro 8.5.0G SR1	OriginLab Corporation

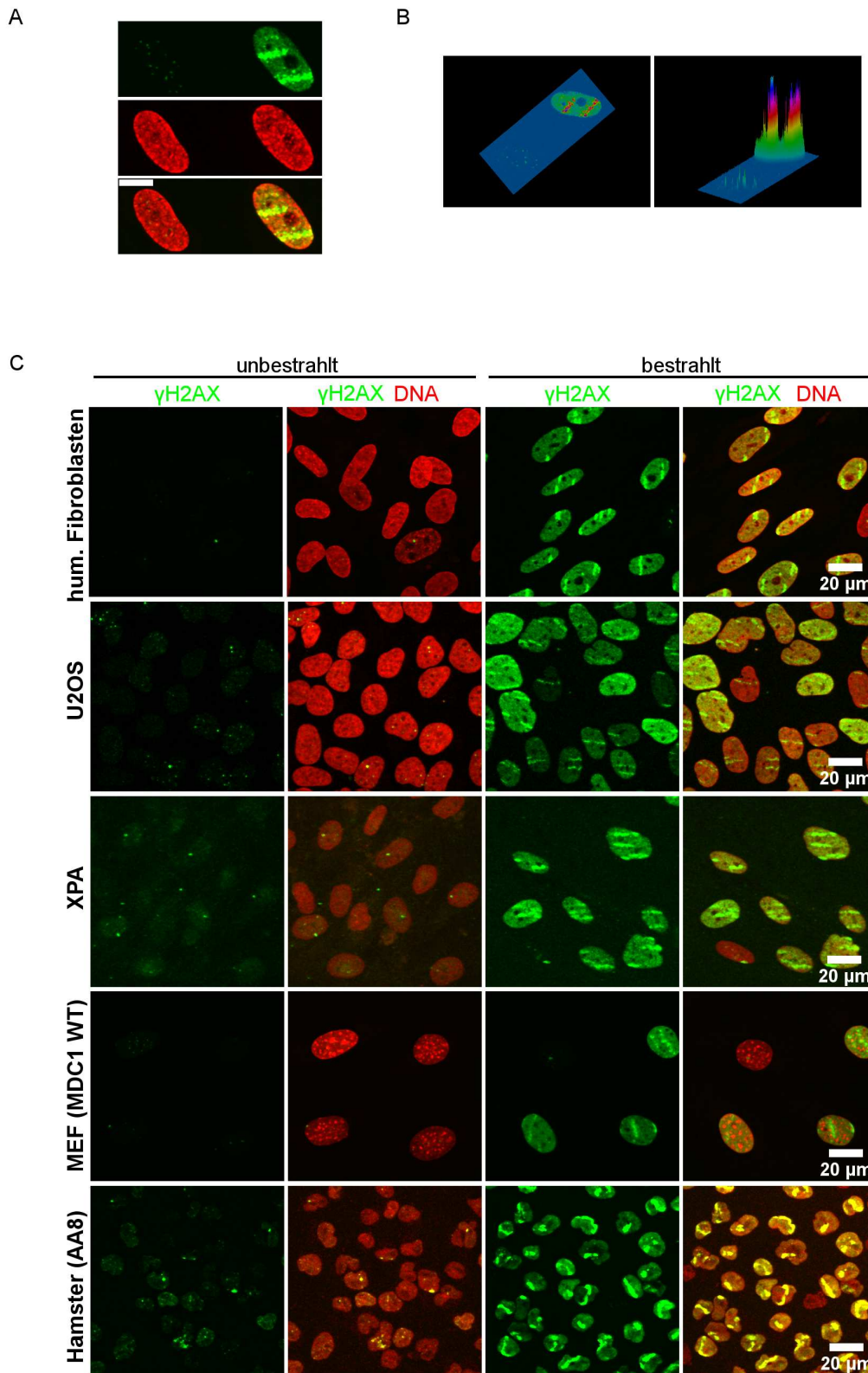
## 4 Ergebnisse

### 4.1 Charakterisierung des pan-nukleären $\gamma$ H2AX-Signals

#### 4.1.1 Kernweite Phosphorylierung von H2AX nach Ionenbestrahlung

Nach Induktion komplexer DNA-Schäden durch sehr schwere Ionen wurde neben dem  $\gamma$ H2AX-Signal an den DNA-Schäden auch eine schwache kernweite H2AX-Phosphorylierung im nicht geschädigten Bereich des Chromatins beobachtet (Jakob et al., 2009). Es ist Ziel dieser Arbeit zu untersuchen, ob die nach Bestrahlung mit schweren Ionen auftretende zusätzliche kernweite H2AX-Phosphorylierung eine spezifische Strahlenreaktion der Zelle darstellt und es sollte eine Charakterisierung dieser kernweiten Antwort erfolgen.

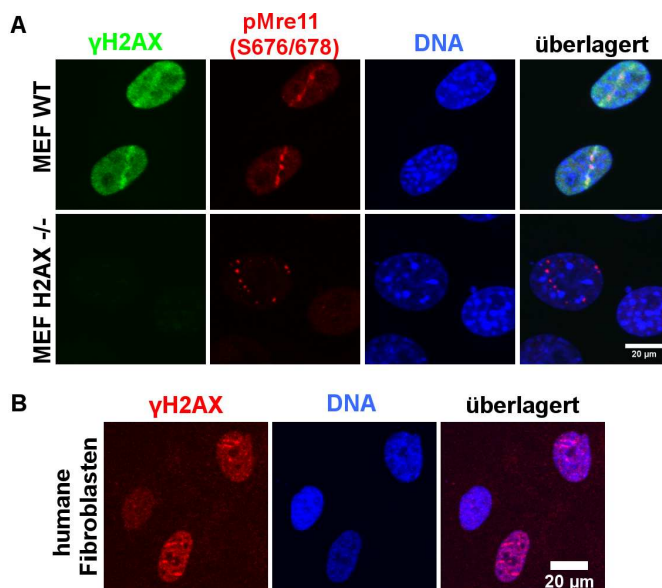
Die Untersuchung der pan-nukleären H2AX-Phosphorylierung erfolgte in dieser Arbeit hauptsächlich in normalen humanen Fibroblasten. Die Zellen wurden meist bei konfluenter Zelldichte untersucht, so dass sich die meisten Zellen in der G1- bzw. G0-Phase befanden, um einen Einfluss möglicher zellzyklusabhängiger Unterschiede der kernweiten H2AX-Phosphorylierung zu minimieren. Dadurch sollten außerdem Unterschiede in der Zellkerngröße zwischen einzelnen Zellen verringert werden, so dass die mittlere Trefferzahl pro Zellkern bei ungerichteter Bestrahlung einer geringeren Streuung unterlag und sich bei Bestrahlung mit einer gleichen Anzahl an Ionen an der Mikrosonde die Anzahl der induzierten DNA-Schäden weniger unterschied. Für mikroskopische Analysen wurden die Zellen meist schräg mit einer Fluenz von 3 bis  $4 \cdot 10^6$  Teilchen/cm<sup>2</sup> (T/cm<sup>2</sup>) bestrahlt, damit die Zellkerne von etwa 1 bis 3 Ionen getroffen wurden und eine gute Unterscheidung zwischen dem Signal an der Ionenspurspur und dem nicht getroffenen Bereich des Zellkerns möglich war. Bei den verwendeten Fluenzen werden aber auch einzelne Zellkerne im bestrahlten Bereich nicht von einem Ion getroffen. Abb. 12 A zeigt exemplarisch die Zellkerne zweier humaner Fibroblasten einer Probe, die schräg mit Goldionen (12800 keV/μm) bestrahlt und 0,5 Stunden nach Bestrahlung fixiert wurde. Es erfolgte die Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX und die Färbung der DNA mit ToPro-3. Der rechte der beiden Zellkerne zeigt ein intensives  $\gamma$ H2AX-Signal entlang der Ionenspuren, dem linken Zellkern fehlt dieses Signal, da dieser nicht von Ionen getroffen wurde. Im bestrahlten Zellkern ist zusätzlich zu dem Signal an der Ionenspurspur ein deutliches, aber schwächeres Signal im restlichen Bereich des Zellkerns erkennbar, das im unbestrahlten Zellkern fehlt. Dieses Signal wird in dieser Arbeit als „pan-nukleäres“ oder „kernweites“  $\gamma$ H2AX-Signal bezeichnet. In Abb. 12 B ist das  $\gamma$ H2AX-Signal für beide Zellkerne noch einmal im 3D-Profil in Aufsicht und in seitlicher Ansicht dargestellt. Es zeigt das über den gesamten bestrahlten Zellkern deutlich erhöhte Signal (grüner Bereich) gegenüber dem nicht bestrahlten Zellkern. Das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal tritt nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Ionen und in verschiedenen untersuchten Zelllinien auf. In Abb. 12 C ist eine Übersicht über das  $\gamma$ H2AX-Signal nach Ionenbestrahlung in verschiedenen Zelllinien dargestellt. Nach Bestrahlung von normalen humanen Fibroblasten mit Kryptonionen (4600 keV/μm) zeigte sich, dass auch nach Bestrahlung mit einem geringeren LET als nach Goldbestrahlung (12800 keV/μm) ein kernweites Signal in diesen Zellen auftritt. Es sollte überprüft werden, ob die kernweite Antwort auch in humanen Tumorzellen induziert wird. Dazu wurden Zellen einer Osteosarkomzelllinie, U2OS Zellen, mit Goldionen (12800 keV/μm) bestrahlt. Desweiteren sollte überprüft werden, ob die kernweite H2AX-Phosphorylierung auch in Zellen aus anderen Spezies stattfindet. Dazu wurden embryonale Mausfibroblasten (MEF Zellen, MDC1 WT) mit Uranionen (15000 keV/μm) bestrahlt und Hamster Zellen (AA8) wurden mit



**Abbildung 12: Das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal nach Ionenbestrahlung.** (A) Humane Fibroblasten wurden mit Goldionen ( $12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ,  $3 \cdot 10^6 \text{ T}/\text{cm}^2$ ) bestrahlt, 0,5 Stunden nach Bestrahlung fixiert und  $\gamma$ H2AX (grün) und das DNA-Signal (rot) mit ToPro-3 gefärbt (Balken =  $10 \mu\text{m}$ ). B zeigt das 3D-Profil des  $\gamma$ H2AX-Signals der beiden in A dargestellten Zellkerne. (C) Humane Fibroblasten wurden mit Kryptonionen ( $4600 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ), U2OS Zellen mit Goldionen ( $12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ), XPA Zellen mit Xenonionen ( $8660 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ), MEF Zellen mit Uranionen ( $15000 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) mit einer Fluenz von jeweils  $3 \cdot 10^6 \text{ T}/\text{cm}^2$  bestrahlt und Hamsterzellen mit 40 Kohlenstoffionen ( $290 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) im Punkt pro Zellkern an der Mikrosonde. Die Zellen wurden eine Stunde nach Bestrahlung fixiert,  $\gamma$ H2AX (grün) wurde detektiert und die DNA mit ToPro-3 (rot) angefärbt.

Kohlenstoffionen (290 keV/ $\mu\text{m}$ ) bestrahlt. Letztere wurden an der Mikrosonde mit 40 Ionen im Punkt wie in Abschnitt 4.1.5 erläutert bestrahlt. Es wurden außerdem XPA-Zellen, die eine Defizienz in der Nukleotidexzisionsreparatur (NER) aufweisen, mit Xenonionen (8660 keV/ $\mu\text{m}$ ) bestrahlt, da gezeigt wurde, dass NER einen Einfluss auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung nach UV-Bestrahlung hat (Marti et al., 2006). Es folgte die Fixierung der Zellen eine Stunde nach Bestrahlung und die Detektion des  $\gamma\text{H2AX}$ -Signals. Nach Ionenbestrahlung ist in allen untersuchten Zelllinien neben der Ionenspur auch eine schwächere Phosphorylierung von H2AX im nicht direkt getroffenen Bereich des Chromatins detektierbar, wobei die Nucleoli vom  $\gamma\text{H2AX}$ -Signal ausgespart sind. Die Phosphorylierung scheint außerdem zwischen den einzelnen Zellen innerhalb einer Zelllinie unterschiedlich stark auszufallen. Während besonders in U2OS und MEF Zellen die Schwankung der Intensität des Signals zwischen den einzelnen Zellen erhöht war, waren auch in humanen Fibroblasten Unterschiede in der kernweiten Phosphorylierung zu beobachten, die jedoch weniger stark ausgeprägt waren.

#### 4.1.2 Spezifität des $\gamma\text{H2AX}$ -Signals



**Abbildung 13: Überprüfung der Spezifität des pan-nukleären  $\gamma\text{H2AX}$ -Signals nach Ionenbestrahlung in H2AX-defizienten Zellen und mit dem polyklonalen anti- $\gamma\text{H2AX}$ -Antikörper aus Kaninchen.** (A) MEF WT und H2AX<sup>-/-</sup> Zellen wurden mit Uranionen (15000 keV/ $\mu\text{m}$ ,  $3 \cdot 10^6$  T/cm<sup>2</sup>) schräg bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung fixiert. Es wurde  $\gamma\text{H2AX}$  (grün) mit dem monoklonalen anti- $\gamma\text{H2AX}$ -Antikörper aus Maus und pMre11 (S676/S678) (rot) detektiert sowie die DNA mit ToPro-3 (blau) gefärbt. (B)  $\gamma\text{H2AX}$  (rot) wurde in humanen Fibroblasten eine Stunde nach Bestrahlung mit Chromionen (2630 keV/ $\mu\text{m}$ ,  $4 \cdot 10^6$  T/cm<sup>2</sup>) mit dem polyklonalen anti- $\gamma\text{H2AX}$ -Antikörper aus Kaninchen detektiert. Die DNA wurde mit ToPro-3 (blau) gefärbt.

Da die Bildung eines pan-nukleären  $\gamma\text{H2AX}$ -Signals außerhalb der S-Phase des Zellzyklus im Zusammenhang mit ionisierender Bestrahlung bisher nicht beschrieben wurde, sollte sicher gestellt werden, dass das detektierte, kernweite Signal spezifisch für  $\gamma\text{H2AX}$  ist. Es sollte also die Möglichkeit ausgeschlossen werden, dass das kernweite Signal dadurch entsteht, dass der verwendete monoklonale anti- $\gamma\text{H2AX}$ -Antikörper aus Maus (Kapitel 3.2.4 Tabelle 3) unspezifisch an ein anderes Protein bindet, das kurze Zeit nach Ionenbestrahlung beispielsweise durch Phosphorylierung modifiziert wird und über den gesamten Zellkern verteilt ist. Deswegen wurde untersucht, ob in Zellen, die kein H2AX exprimieren, nach Ionenbestrahlung ebenfalls ein kernweites Signal detektierbar ist. Es wurden H2AX<sup>-/-</sup> und WT MEF Zellen eine Stunde nach schräger Bestrahlung mit Uranionen (15000 keV/ $\mu\text{m}$ ) fixiert und das  $\gamma\text{H2AX}$ -Signal untersucht. Zur Markierung der bestrahlten Zellen, musste ein Reparaturprotein angefärbt werden, das auch bei Abwesenheit von H2AX an die DNA-Schäden bindet. Es wurde phosphoryliertes Mre11 (S676, S678) detektiert, da Mre11 im MRN-

Es wurde phosphoryliertes Mre11 (S676, S678) detektiert, da Mre11 im MRN-

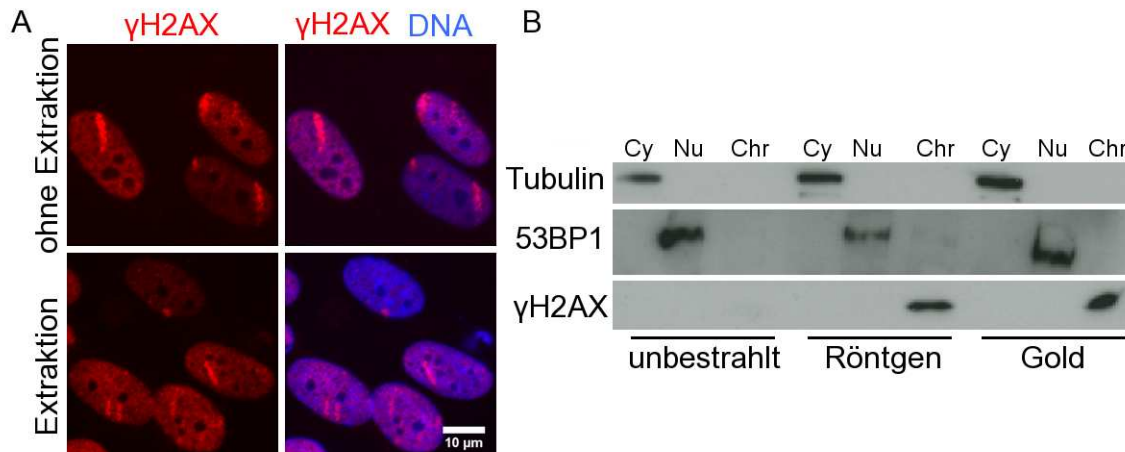
Komplex an den frühen Schritten der DNA-Schadenserkennung beteiligt ist (Williams et al., 2010). In H2AX<sup>-/-</sup> Zellen kommt es nach Ionenbestrahlung bei Verwendung des monoklonalen anti- $\gamma$ H2AX-Antikörpers weder zu einer Anfärbung der Schadensfoci, noch zu einer Bindung des Antikörpers im unbeschädigten Bereich des Zellkerns (Abb. 13 A). Es kann also davon ausgegangen werden, dass dieser Antikörper spezifisch die Modifizierung von H2AX detektiert.

Um dieses Ergebnis weiter zu bestätigen, wurde  $\gamma$ H2AX mit einem anderen anti- $\gamma$ H2AX-Antikörper detektiert, einem polyklonalen Antikörper aus Kaninchen (Kapitel 3.2.4 Tabelle 3). Die Immunfluoreszenzfärbung wurde in humanen Fibroblasten eine Stunde nach Bestrahlung mit Chromionen (2630 keV/ $\mu$ m) durchgeführt. Auch hier ist das kernweite Signal im unbeschädigten DNA-Bereich klar sichtbar, aber nur dann, wenn die Zelle durch Ionen getroffen wurde und ein  $\gamma$ H2AX-Signal an der Ionenspur aufweist (Abb. 13 B). Dieses Ergebnis deutet also darauf hin, dass die beiden Antikörper nicht unspezifisch binden und für die Untersuchung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung verwendet werden können. Da der monoklonale anti- $\gamma$ H2AX-Antikörper aus Maus mit einer höheren Verdünnung eingesetzt werden konnte und dabei deutlichere Signale lieferte, wurde dieser Antikörper für die weiteren Analysen am Mikroskop und die Intensitätsmessungen verwendet.

### 4.1.3 Chromatingebundenheit von $\gamma$ H2AX nach Ionenbestrahlung

Im Weiteren sollte überprüft werden, ob das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal dadurch entsteht, dass tatsächlich H2AX im nicht getroffenen Bereich phosphoryliert wird oder ob es durch frei diffundierende  $\gamma$ H2AX-Moleküle verursacht wird. Für humane Zellen kann nicht ausgeschlossen werden, dass wie für *Drosophila melanogaster* beschrieben (Kusch et al., 2004)  $\gamma$ H2AX, das in der Umgebung der geschädigten DNA im Chromatin entstanden ist, dort durch Remodeling-Komplexe im Rahmen von Chromatindekondensierung oder bei abgeschlossener Reparatur ausgetauscht wird. Eine hohe Anzahl an ausgetauschten, frei diffundierenden  $\gamma$ H2AX-Molekülen im Nukleoplasma könnte zur Bildung des beobachteten pan-nukleären Signals führen. Um diese Möglichkeit zu untersuchen, wurden humane Fibroblasten mit Rutheniumionen (7060 keV/ $\mu$ m) schräg bestrahlt und eine Stunde später direkt vor der Fixierung das lösliche Protein aus den Zellen extrahiert. Abb. 14 A zeigt, dass das kernweite Signal nach dieser Behandlung erhalten bleibt. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei dem detektierten Signal um gebundenes  $\gamma$ H2AX handelt.

Darüber hinaus wurde die Lokalisation von  $\gamma$ H2AX am Chromatin nach Ionenbestrahlung mittels subzellulärer Proteinfractionierung und Western Blot Analyse überprüft. Es wurden Proteinlysate von humanen Fibroblasten eine Stunde nach Bestrahlung mit Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) hergestellt, wobei eine Auftrennung des Proteins in verschiedene Fraktionen durchgeführt wurde, in cytoplasmatisches, nukleoplasmatisches und fest im Chromatin verankertes Protein. Es wurde untersucht, ob es neben dem erwarteten Anteil von  $\gamma$ H2AX in der Chromatinfraction einen Anteil an ungebundenem  $\gamma$ H2AX in der Nukleoplasmafraction gibt. Für die senkrechte Bestrahlung der Zellen wurde eine Fluenz von  $3 \cdot 10^6$  T/cm<sup>2</sup> gewählt, wodurch die Fibroblasten durchschnittlich von 7 Ionen im Zellkern getroffen werden. Diese Fluenz wurde verwendet, da einerseits die Dosis hoch genug sein musste, um ein deutliches pan-nukleäres Signal hervorzurufen, aber gleichzeitig die Fläche an nicht getroffener DNA im Vergleich zum Bereich getroffener DNA überwiegen sollte. Als Vergleich zur Ionenbestrahlung wurden die Proteinfractionen von humanen Fibroblasten nach 30 Gy Röntgenbestrahlung und von unbestrahlten Zellen untersucht. Neben der Detektion von  $\gamma$ H2AX wurde die



**Abbildung 14: Überprüfung der Chromatingebundenheit von  $\gamma$ H2AX nach Bestrahlung mit Goldionen.** (A) Eine Stunde nach schräger Bestrahlung von humanen Fibroblasten mit Rutheniumionen ( $7060 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ,  $3 \cdot 10^6 \text{ T}/\text{cm}^2$ ) wurde lösliches Protein aus den Zellen extrahiert, die Zellen fixiert oder ohne Extraktion fixiert und  $\gamma$ H2AX (rot) detektiert. Die DNA wurde mit ToPro-3 (blau) angefärbt. (B) Eine Stunde nach senkrechter Bestrahlung mit Goldionen ( $12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ,  $3 \cdot 10^6 \text{ T}/\text{cm}^2$ ) wurde Protein aus humanen Fibroblasten schrittweise isoliert, so dass das Protein der cytoplasmatischen (Cy), nukleoplasmatischen (Nu) und der an das Chromatin gebundenen Fraktion (Chr) aufgetrennt wurde. Zur Kontrolle wurden die verschiedenen Fraktionen von unbestrahlten und mit 30 Gy Röntgenstrahlen bestrahlten Zellen mitgeführt. Der Anteil an  $\gamma$ H2AX in den verschiedenen Fraktionen wurde mittels Western Blot Analyse untersucht und Tubulin als cytoplasmatisches und 53BP1 als nukleoplasmatische Protein zur Kontrolle der Fraktionierung detektiert.

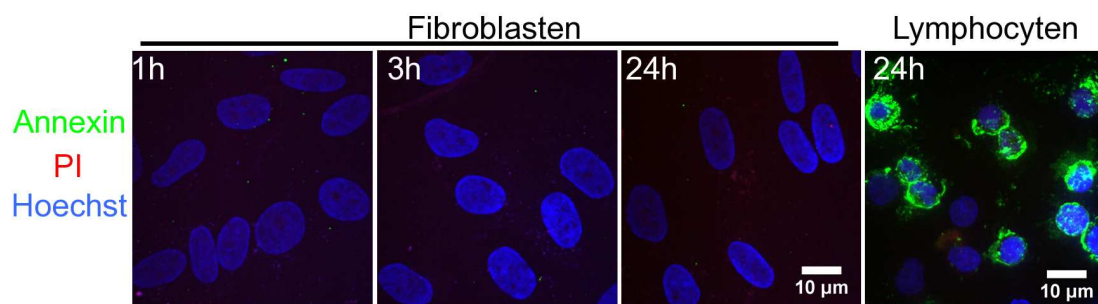
saubere Auftrennung der verschiedenen Fraktionen durch Detektion von Tubulin, einer Komponente des Cytoskeletts, für die Cytoplasmafraktion und 53BP1 für die Nukleoplasmafraktion überprüft. In Abb. 14 B sind die Ergebnisse dieser Analysen gezeigt.  $\gamma$ H2AX ist nur nach Bestrahlung detektierbar und nur in der Chromatinfraction lokalisiert, sowohl nach Röntgen- als auch nach Ionenbestrahlung. Da bei dieser Methode, das gesamte Protein des Chromatins aller Zellkerne vereinigt wird, kann nicht unterschieden werden, ob das Signal von  $\gamma$ H2AX verursacht wird, das sich direkt am Schaden oder im kernweiten Bereich befand. Da jedoch nur die Chromatinfraction ein  $\gamma$ H2AX-Signal aufweist, die Nukleoplasmafraktion jedoch nicht, lässt sich schlussfolgern, dass es sich sowohl beim  $\gamma$ H2AX-Signal am Schaden als auch bei dem Signal im unbeschädigten Bereich um gebundenes Histon handelt. Da sich Tubulin jeweils nur in der Cytoplasmafraktion befindet und 53BP1 nur in der Nukleoplasmafraktion, war die Auftrennung der Proteine in die verschiedenen Fraktionen erfolgreich. Man würde jedoch erwarten, dass ein Teil des 53BP1 nach Bestrahlung an das Chromatin bindet. Bei diesem stringenten Fraktionierungsprotokoll jedoch befindet sich auch nach Bestrahlung das gesamte 53BP1 nur in der Nukleoplasmafraktion. Es verbleibt also nur sehr fest an das Chromatin gebundenes Protein in der Chromatinfraction. Dieses Ergebnis verdeutlicht eine klare Chromatingebundenheit von  $\gamma$ H2AX nach Ionenbestrahlung sowohl in der Nähe des DNA-Schadens, als auch im nicht betroffenen Bereich des Chromatins.

#### 4.1.4 Überprüfung eines Zusammenhangs der Induktion von pan-nukleärem $\gamma$ H2AX und Apoptose nach Ionenbestrahlung

In der Literatur wurde die Induktion einer kernweiten Phosphorylierung von H2AX in Zellen in verschiedenen Stresssituationen beschrieben (vergleiche Kapitel 2.3.2). Rogakou et al. (2000) zeigen, dass eine Phosphorylierung von H2AX während der Fragmentierung der DNA beim Eintreten von



Zellen in die Apoptose induziert wird. Da die DNA durch Bestrahlung mit schweren Ionen massiv geschädigt wird und schwer reparierbare komplexe Schäden entstehen, wäre ein Zusammenhang zwischen dem kernweiten Signal und einem Eintreten von Apoptose denkbar und sollte daher untersucht werden. Da das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal bereits frühzeitig nach Bestrahlung auftritt, sollte ein Marker verwendet werden, der apoptotische Zellen schon in frühen Stadien der Apoptose nachweisen kann. Da eines der ersten Ereignisse während der Apoptose die Umlagerung von Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran ist (Martin et al., 1995), sollte diese durch Annexin-Bindung detektiert werden. Dazu wurden humane Fibroblasten 1, 3 und 24 Stunden nach senkrechter Bestrahlung mit Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) mit Fluorescein-gekoppeltem Annexin gefärbt und fixiert. Um eine gleichzeitige Unterscheidung von nekrotischen Zellen zu gewährleisten, wurde zusätzlich mit dem DNA-Farbstoff Propidiumiodid (PI) gefärbt, der nur in die Zellen gelangen kann, wenn die Zellmembran nicht mehr intakt ist. Der membrangängige Lebendzellfarbstoff Hoechst wurde verwendet, um die DNA aller Zellkerne detektieren zu können. Da Lymphocyten nach ionisierender Bestrahlung zu einem höheren Anteil in Apoptose gehen als andere Zelltypen (Suciu, 1983), wurden humane Lymphocyten als Positiv-Kontrolle für apoptotische Zellen mit 10 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt und 24 Stunden später analysiert. Hier zeigen sich deutliche Annexin-Signale, jedoch ohne eine Anfärbung der Zellkerne durch PI, was bedeutet, dass die Zellen apoptotisch sind. Die mit Goldionen bestrahlten humanen Fibroblasten weisen zu allen untersuchten Zeitpunkten weder eine PI- noch eine Annexin-Färbung auf (Abb. 15). Da ein kernweites  $\gamma$ H2AX-Signal eine Stunde nach Bestrahlung in humanen Fibroblasten vorhanden ist, jedoch zu diesem Zeitpunkt und auch 24 Stunden nach Bestrahlung keine morphologischen Anzeichen für Apoptose wie Kondensierung der DNA und Bildung von Apoptosekörpern sichtbar sind, kann Apoptose als Ursache für die kernweite H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung ausgeschlossen werden.



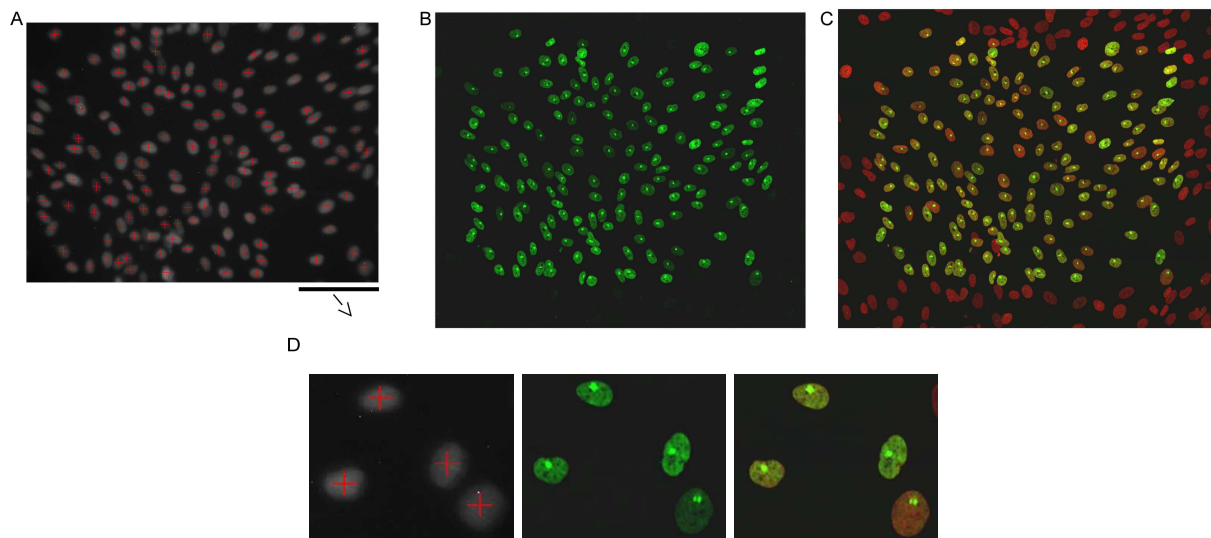
**Abbildung 15: Nachweis von Apoptose in humanen Fibroblasten nach Goldionen- und in Lymphocyten nach Röntgenbestrahlung.** Humane Fibroblasten wurden senkrecht mit Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m,  $3 \cdot 10^6$  T/cm<sup>2</sup>) bestrahlt und 1, 3 und 24 Stunden nach Bestrahlung zur Detektion apoptotischer Zellen mit Annexin (grün), mit Hoechst (blau) zur Detektion aller Zellkerne und mit PI (rot) für den Nachweis von nekrotischen Zellen gefärbt und fixiert. Als Positivkontrolle dargestellt ist die Annexin-, PI- und Hoechstoffärbung von Lymphocyten, bei denen Apoptose 24 Stunden zuvor durch 10 Gy Röntgenbestrahlung induziert wurde.

#### 4.1.5 Quantifizierung des pan-nukleären $\gamma$ H2AX-Signals

Um eine weitere Charakterisierung der kernweiten Schadensantwort zu ermöglichen, sollte eine genaue Quantifizierung der pan-nukleären H2AX-Phosphorylierung erfolgen. Da jedoch nicht das  $\gamma$ H2AX an den DNA-Schadensfoci erfasst werden sollte, sondern hauptsächlich das Signal im unbeschädigten Bereich, sollte eine Methode verwendet werden, bei der eine Unterscheidung der



beiden Signale möglich ist. Deshalb wurde eine mikroskopische Methode gewählt und die Immunfluoreszenzintensität von  $\gamma$ H2AX anhand von Laserscanning-Mikrographen quantifiziert. Es wurde außerdem die gezielte Bestrahlung mit der Mikrosonde durchgeführt, da es dadurch möglich ist, jede Zelle mit genau der gleichen Anzahl an Ionen zu bestrahlen und diese in nur einen Punkt im Zellkern zu zielen, so dass auch bei einer Bestrahlung mit einer hohen Anzahl an Ionen nur ein einzelner mikroskopisch detektierbarer Schadensfokus entsteht. Abb. 16 zeigt ein Bestrahlungsfeld in einer Probe konfluenter humaner Fibroblasten, wie es mit dem Mikroskop an der Mikrosonde erfasst wurde. Die automatische Zellkernerkennung durch die Software erfolgt anhand der Hoechstfärbung direkt vor der Bestrahlung (Abb. 16 A). Die erkannten Zellkerne wurden automatisch durch rote Kreuze markiert und anschließend jeweils im Zentrum des Kreuzes mit genau 40 Kohlenstoffionen im Punkt bestrahlt. Abb. 16 B und C zeigen das gleiche Bestrahlungsfeld wie Abb. 16 A, aber eine Stunde nach Bestrahlung und außerdem wurden hier zusätzlich auch die unbestrahlten Zellen erfasst, die sich direkt um das Bestrahlungsfeld herum befinden. Abb. 16 B zeigt das  $\gamma$ H2AX-Signal der Zellen eine Stunde nach Bestrahlung, Abb. 16 C das  $\gamma$ H2AX- und das DNA-Signal übereinandergelagert und Abb. 16 D jeweils einen vergrößerten Ausschnitt aus A, B und C. Die bestrahlten Zellen zeigen ein deutliches pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX-Signal, sowie einen  $\gamma$ H2AX-Focus. Hier ist gut zu erkennen, dass bei der gezielten Bestrahlung mit 40 Kohlenstoffionen nur ein Schadensfokus detektiert wird. Die unbestrahlten Kontroll-Zellen befinden sich in der gleichen Probe direkt um die bestrahlten Zellen herum und zeigen kein  $\gamma$ H2AX-Signal. Das  $\gamma$ H2AX- und das DNA-Signal wur-



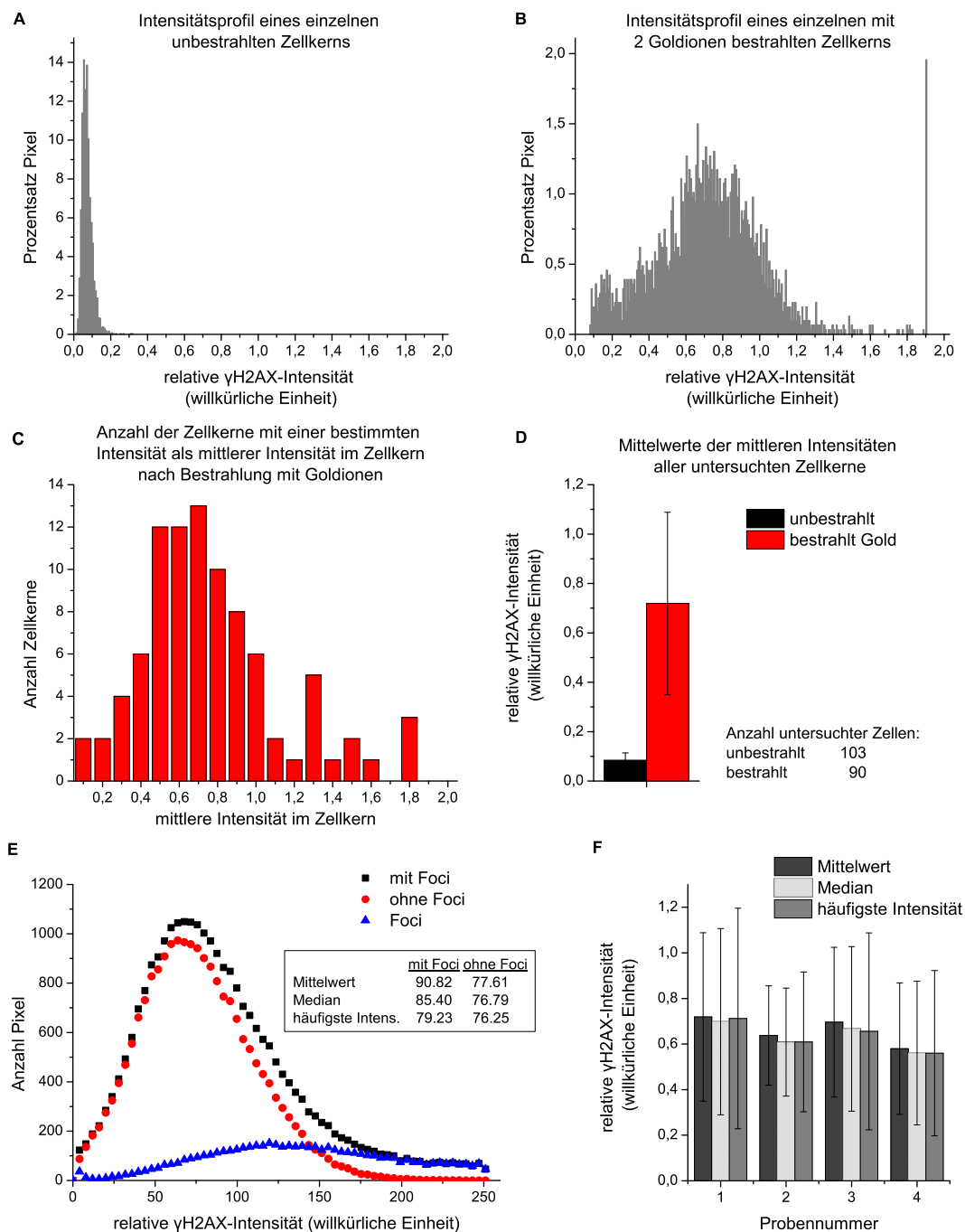
**Abbildung 16: Zellkernerkennung und Detektion des  $\gamma$ H2AX-Signals in einem Bestrahlungsfeld bei Mikrosondenbestrahlung.** (A) Die Zellkerne von humanen Fibroblasten werden in einem Bestrahlungsfeld an der Mikrosonde mit einem 20x Objektiv anhand der Hoechstfärbung erkannt und mit Kreuzen markiert. Die Zellen wurden mit 40 Kohlenstoffionen (290 keV/ $\mu$ m) pro Zellkern im Punkt bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung fixiert. In B und C ist das gleiche Feld in der Probe und der umliegende Bereich mit unbestrahlten Zellen gezeigt. (B) Das  $\gamma$ H2AX-Signal ist in grün und in (C)  $\gamma$ H2AX zusammen mit dem DNA-Signal (rot) nach der ToPro-3-Färbung dargestellt. Für B und C wurden je 20 Einzelbilder zusammengefügt, die am konfokalen Laserscanning-Mikroskop mit einem 63x Objektiv aufgenommen wurden. (D) Ein Abschnitt aus A, B und C wurde vergrößert dargestellt.

den mit dem konfokalen Laserscanning-Mikroskop erfasst und die Quantifizierung durchgeführt wie im Folgenden und in Kapitel 3.1.8 beschrieben. Durch die Bestrahlung an der Mikrosonde ergibt sich der Vorteil, dass der Bereich des DNA-Schadens auf einen Punkt im Zellkern begrenzt werden kann und diese Pixel nur einen kleinen Anteil aller Pixel im Zellkern ausmachen. Durch die

mikroskopische Analyse können außerdem die Pixel am Schadensfocus, die eine sehr hohe Intensität aufweisen, aus der Auswertung ausgenommen werden. Hierfür werden die Einstellungen bei der Aufnahme so gewählt, dass diese Pixel in Sättigung sind, also die höchste messbare Intensität aufweisen und diese maximale Intensität aus dem Intensitätsprofil entfernt wird. Allerdings sind die  $\gamma$ H2AX-Foci nicht immer innerhalb eines Experiments gleich intensiv, wenn beispielsweise defiziente Zelllinien untersucht wurden oder mit Inhibitor gearbeitet wurde. Die Foci konnten daher nicht immer in Sättigung aufgenommen werden, machen aber dennoch nur einen kleinen Teil der Pixel im gesamten Zellkern aus. Abb. 17 zeigt Beispiele für die Intensitätsprofile, also die Verteilung der Intensitäten der einzelnen Pixel, eines unbestrahlten (Abb. 17 A) und eines mit 2 Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) bestrahlten Zellkerns (Abb. 17 B) eine Stunde nach Bestrahlung. Der höchste Balken am Ende des Intensitätsprofils stellt die Pixel dar, die in Sättigung aufgenommen wurden, also die Pixel der Foci, die bei der weiteren Auswertung nicht berücksichtigt wurden. Im unbestrahlten Zellkern haben die Pixel eine geringe Intensität, während nach Bestrahlung mehr Pixel mit einer höheren  $\gamma$ H2AX-Intensität auftreten.

Für jeden untersuchten Zellkern wurde anschließend der Mittelwert aus den Intensitäten aller Pixel gebildet. Abb. 17 C zeigt wieviele der untersuchten Zellkerne nach Bestrahlung eine bestimmte Intensität als mittlere Intensität besaßen. Die Verteilung folgt keiner Normalverteilung wie mittels Chi-Quadrat-Test überprüft wurde (vergleiche Kapitel 3.1.11). Wird nun der Mittelwert der mittleren Intensitäten aller Zellkerne gebildet, erhält man eine Aussage über das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal der Zellen einer Probe, so dass verschiedene Proben miteinander verglichen werden können. Nach Bestrahlung kommt es zu einem klaren Anstieg des pan-nukleären Signals im Vergleich zur unbestrahlten Kontrolle (Abb. 17 D). Dass auch in den unbestrahlten Zellen ein geringer Intensitätswert zu messen ist, resultiert wahrscheinlich aus den Signalen der Kontrollfoci, die nicht in Sättigung sind, oder aus der Eigenfluoreszenz der Zellkerne. Es sind jedoch auch eine mögliche minimale kernweite H2AX-Phosphorylierung oder eine geringe unspezifische Bindung des Antikörpers nicht auszuschließen. Die Standardabweichungen sind relativ hoch und liegen für die unbestrahlte Kontrolle bei 37%, für die bestrahlte Probe bei 45%. Sie spiegeln die Verteilung der Intensitäten der einzelnen Kerne wieder und bedeuten, dass einzelne Zellen trotz der Bestrahlung mit einer gleichen Anzahl an Ionen ein unterschiedlich starkes kernweites  $\gamma$ H2AX-Signal ausbilden. In den weiteren Analysen (vergleiche folgende Kapitel) bewegt sich die Standardabweichung meist in diesem Bereich auch bei einer meist hohen Anzahl an analysierten Zellen in einer Probe.

Als repräsentativer Wert für die Einzelkern-Intensitätsprofile wurde jedoch nicht nur der Mittelwert aller Intensitäten eines Zellkerns, sondern auch der Median und die häufigste Intensität jedes Zellkerns (Modalwert) in Betracht gezogen und diese drei Möglichkeiten miteinander verglichen. Diese Untersuchungen wurden in Zusammenarbeit mit der Abteilung Materialforschung der GSI durchgeführt. Da die Foci, auch wenn sie sich in Sättigung befinden, am Rand nicht gesättigte Pixel hoher Intensität aufweisen, gehen die Pixel der Foci trotz Aufnahme in Sättigung zu einem geringen Teil in die Auswertung mit ein. Es wurde überprüft, wie stark der Mittelwert, Median oder die häufigste Intensität durch diese Pixel der Foci beeinflusst werden. Dazu wurde nach Bestrahlung mit 10 Nickelionen die Pixel der Foci vollständig aus den Aufnahmen entfernt, inklusive der Pixel nicht gesättigter Intensität am Rand der Foci. Die Intensitätsprofile aller Zellkerne wurden aufsummiert und die genannten Werte mit und ohne Foci berechnet (durchgeführt von Bruno Merk und Dr. Kay-Obbe



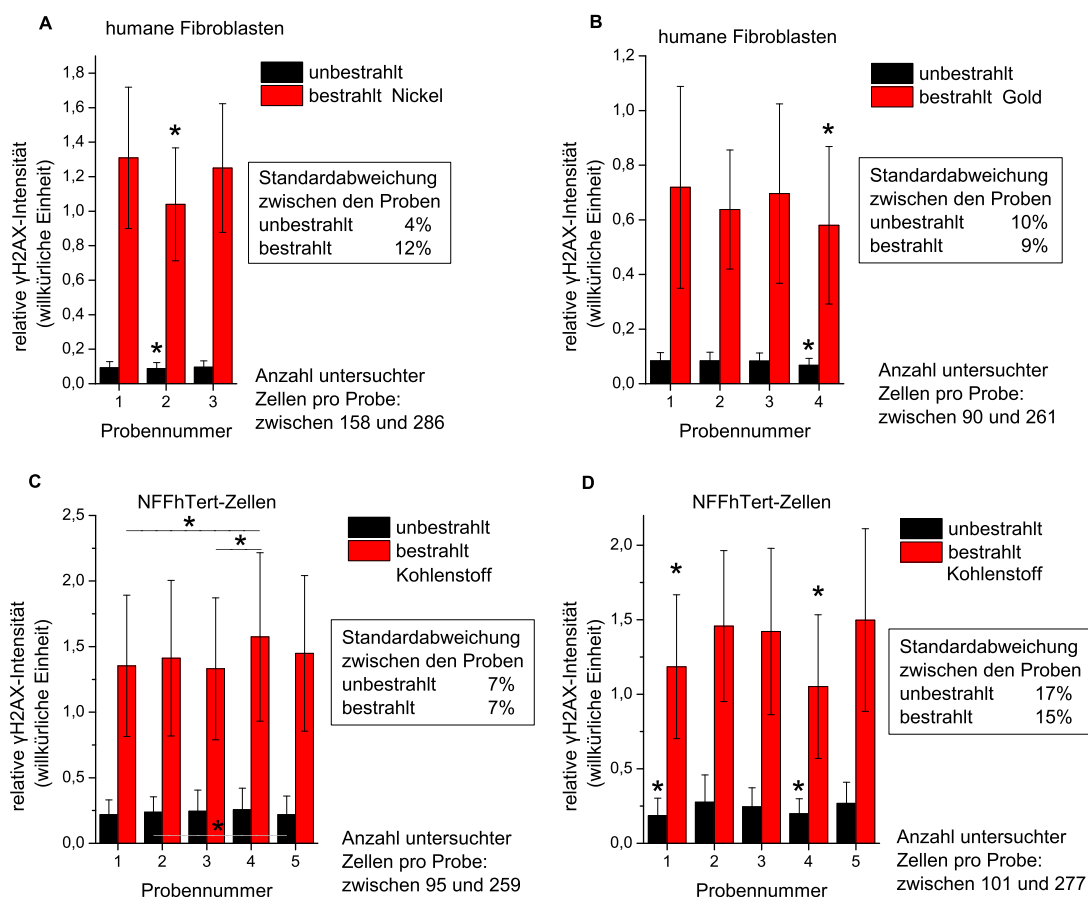
**Abbildung 17: Quantifizierung des kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signals.** Humane Fibroblasten wurden an der Mikrosonde mit 2 Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) pro Zellkern im Punkt bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung fixiert. Nach Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX wurde für jeden Pixel im Zellkern das  $\gamma$ H2AX-Signal durch Aufnahmen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop erfasst. A zeigt ein Intensitätsprofil eines unbestrahlten, B eines bestrahlten Zellkerns. C zeigt für die bestrahlte Probe die Anzahl an Zellkernen mit einer bestimmten Intensität als mittlerer Intensität. Bei D wurden die Mittelwerte der mittleren Intensitäten aller Zellkerne gebildet. (E) zeigt die Summe von Intensitätsprofilen von humanen Fibroblasten, die mit Nickelionen bestrahlt wurden. Es wurde der Mittelwert aus den Mittelwerten, den Medianen und den häufigsten Intensitäten aller Zellkerne gebildet und mit den Werten nach vollständigem Entfernen der Foci verglichen (Bild freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. Kay-Obbe Voss). F zeigt einen Vergleich zwischen Mittelwert, Median und häufigster Intensität für vier gleich behandelte Proben nach Bestrahlung mit Goldionen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Voss). Es zeigte sich, dass die häufigste Intensität weniger durch die Pixel der Foci beeinflusst wird als der Median und Mittelwert (Abb. 17 E) (Meyer et al., 2010). Allerdings wurden in der gezeigten Abbildung die Intensitätsprofile mehrerer Zellkerne aufsummiert, so dass sich ein glatter Kurvenverlauf ergibt und der häufigste Intensitätswert dem Maximum im Intensitätsprofil entspricht. In den Profilen der einzelnen Zellkerne, ergibt sich keine glatte Kurve und der jeweils häufigste Intensitätswert liegt zufällig um das eigentliche Maximum der Kurve herum. Daher ist der Wert der häufigsten Intensität einer höheren Streuung unterworfen als der Mittelwert oder der Median. Abb. 17 F zeigt, einen Vergleich der drei Werte für vier Proben konfluenter humaner Fibroblasten, die jeweils mit 2 Goldionen bestrahlt wurden (vergleiche auch Abb. 18 B). Es zeigt sich, dass die Mittelwerte jeweils etwas höher sind als der Median oder die häufigste Intensität, aber dass die unterschiedlichen Auswertemethoden nur einen geringen Einfluss auf das Ergebnis haben. Da der Mittelwert jedoch geringeren zufälligen Streuungen unterworfen ist, wurde dieser Wert für die weitere Auswertung verwendet.

Da es sich bei der Erfassung der Intensität von Immunfluoreszenzsignalen um eine sehr sensitive Methode handelt, sollte überprüft werden, wie reproduzierbar die Ergebnisse für die Intensitätsmessung sind, also wie hoch die Variabilität zwischen einzelnen gleich behandelten Proben innerhalb eines Experiments ist. Deswegen wurden in mehreren Experimenten die Intensitäts-Mittelwerte gleich behandelter Proben miteinander verglichen. Abb. 18 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. In A wurden humane Fibroblasten mit 5 Nickelionen ( $3800 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ), in B mit 2 Goldionen ( $12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) pro Zellkern bestrahlt. Um die Abweichung zwischen den Proben zu quantifizieren, wurde die Standardabweichung zwischen den Proben eines Experiments ermittelt. Sie liegt für die unbestrahlten Kontrollen bei 4% und 10%, für die bestrahlten Proben bei 12% und 9%. Es wurden außerdem immortalisierte humane Fibroblasten (NFFhTert) mit 40 Kohlenstoffionen ( $290 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) pro Zellkern bestrahlt, wobei die Proben aus C mit Transfektionsreagenz ohne siRNA behandelt waren, während in D die Proben mit siRNA behandelt waren, jedoch ohne eine Herunterregulierung des Proteins zu erzielen. Diese Zellen wurden deshalb verwendet, da für spätere Analysen (siehe Kapitel 4.6.1) eine Herunterregulierung von Protein nicht nur in U2OS Zellen, sondern auch in Fibroblasten durchgeführt werden sollte, da für diese wie in 4.1.1 beschrieben, eine geringere Variabilität der kernweiten Antwort zwischen einzelnen Zellen erwartet wurde als für U2OS Zellen. Es wurde die Standardabweichung zwischen gleich behandelten Proben ermittelt. Diese liegt für die unbestrahlten Kontrollen bei 7% und 17%, für die bestrahlten Proben bei 7% und 15%. Es zeigte sich also, dass sich gewisse Schwankungen zwischen gleich behandelten Proben ergeben. Es sollte überprüft werden, ob gleich behandelte Proben sich statistisch signifikant voneinander unterscheiden. Da die Messwerte nicht normalverteilt sind, kann der Student's T-Test nicht auf diese Proben angewendet werden. Stattdessen wurde der Mann-Whitney-Test (U-Test) angewendet, um zu überprüfen, ob bei dieser Quantifizierungsmethode signifikante Unterschiede zwischen gleich behandelte Proben bestehen. Es zeigte sich, dass sich gleich behandelte und parallel gefärbte Proben anhand dieses Tests teilweise signifikant voneinander unterscheiden, obwohl die Aufnahmen und die Auswertung nach standardisierten und optimierten Bedingungen durchgeführt wurden. Da wegen der aufwendigen Bestrahlung an der Mikrosonde (vergleiche Kapitel 3.1.4.3) oft nur wenige oder einzelne Proben miteinander verglichen werden konnten, war ein Signifikanz-Test nicht hilfreich, um eine Aussage über einen möglichen biologischen Effekt einer Behandlung treffen zu können. Daher wurde in den folgenden Experimenten

auf einen Test der Signifikanz verzichtet.

Die durchschnittliche Standardabweichung aus allen Experimenten liegt für die bestrahlten Proben bei  $11\% \pm 4$  und die unbestrahlten Proben bei  $10\% \pm 6$ , der Unterschied zwischen zwei einzelnen Proben betrug jedoch in den durchgeführten Kontrollexperimenten bis zu 30 % (Abb. 18 D Probe 4 und 5). Dieser Fehler muss bei der Bewertung der später durchgeführten Messergebnisse be-



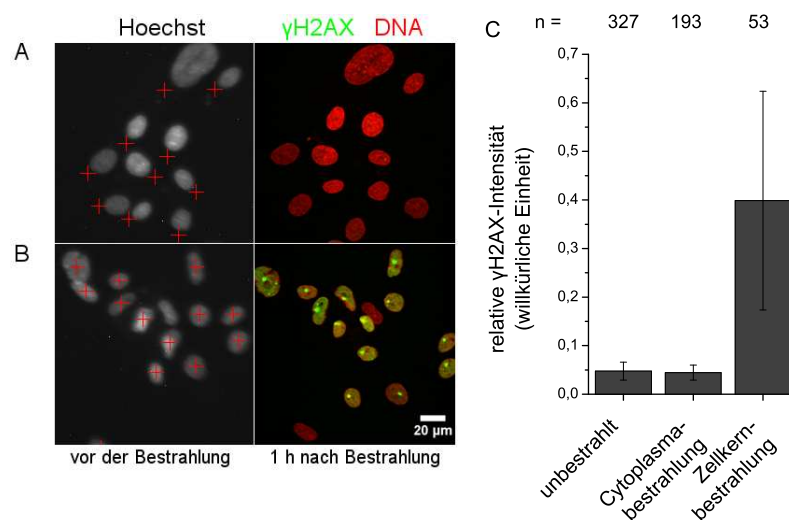
**Abbildung 18: Abschätzung der Variabilität des  $\gamma$ H2AX-Signals zwischen einzelnen gleich behandelten Proben.**

(A) Konfluente humane Fibroblasten (AG1522) wurden mit 5 Nickelionen ( $3800 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ), (B) mit 2 Goldionen ( $12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) oder (C und D) immortalisierte humane Fibroblasten (NFFhTert) mit 40 Kohlenstoffionen ( $290 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) pro Zellkern bestrahlt, wobei die Zellen in C mit Transfektionsreagenz behandelt waren und bei D eine Transfektion mit siRNA versucht wurde. Das Immunfluoreszenzsignal von  $\gamma$ H2AX eine Stunde nach Bestrahlung wurde quantifiziert und die Standardabweichung zwischen den gleich behandelten Proben ermittelt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung für die einzelnen Proben. Es wurden jeweils die Werte der bestrahlten oder unbestrahlten Zellen miteinander mittels Mann-Whitney-Test verglichen. \* = signifikant unterschiedliche Proben mit  $p < 0,05$ .

rücksichtigt werden und bedeutet, dass ein Unterschied zwischen einzelnen Proben, der in diesem Bereich liegt, keine Aussage über einen tatsächlichen Unterschied zwischen diesen beiden Proben ermöglicht. Um eine klare Aussage treffen zu können, müssen daher die erzielten Ergebnisse durch wiederholte Versuche oder verschiedene experimentelle Ansätze bestätigt werden. Wie bereits erwähnt, war bei Mikrosondenbestrahlung die Untersuchung einer hohen Anzahl an Proben nicht immer möglich.

#### 4.1.6 Entstehung von $\gamma$ H2AX nach gezielter Bestrahlung der Zellkerne oder des Cytoplasmas

Im Folgenden wurde untersucht, ob die kernweite Phosphorylierung von H2AX auf die Induktion von komplexen DNA-Schäden zurückzuführen ist oder ob sie als generelle Stressreaktion auf Beschädigung beispielsweise der Membran oder von Proteinen im Cytoplasma nach Ionenbestrahlung passiert. Deswegen wurden mit Hilfe der Mikrosonde gezielt die Zellkerne oder das Cytoplasma normaler humaner Fibroblasten mit einem Goldion (12800 keV/ $\mu$ m) bestrahlt und das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal eine Stunde nach Bestrahlung quantifiziert. Für die Bestrahlung des Cytoplasmas wurde durch die Software anhand der Hoechstfärbung automatisch die Längsachse des Zellkerns erkannt und das Ion an dieser Längsachse 20  $\mu$ m neben das Zentrum des Zellkerns gezielt. Bei der Bestrahlung des Cytoplasmas wurden die Zellen in 16 Bestrahlungsfeldern direkt neben bzw. untereinander bestrahlt und die Ränder des zusammenhängenden Bestrahlungsfeldes zusätzlich zur Verwendung der Referenzmarken dadurch markiert, dass einzelne Zellen im Kern bestrahlt wurden und so sicher durch den Schadensfokus und das pan-nukleäre Signal erkannt werden konnten. Von diesen Zellkernen wurden keine Aufnahmen gemacht, sondern nur von den nicht im Kern bestrahlten Zellen innerhalb des Bestrahlungsfeldes. Nach Bestrahlung ist in den im Kern bestrahlten Zellen ein deutliches pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX-Signal und der Schadensfokus sichtbar (Abb. 19 B). Bei den im Cytoplasma bestrahlten Zellen ist optisch kein pan-nukleäres Signal zu erkennen (Abb. 19 A). Die Messung bestätigte, dass sich die Intensität des  $\gamma$ H2AX-Signals in den im Cytoplasma bestrahlten Zellen auf dem Niveau der unbestrahlten Zellen befindet, während im Kern bestrahlte Zellen im Vergleich zu den Kontrollen ein deutliches kernweites  $\gamma$ H2AX-Signal aufweisen (Abb. 19 C).



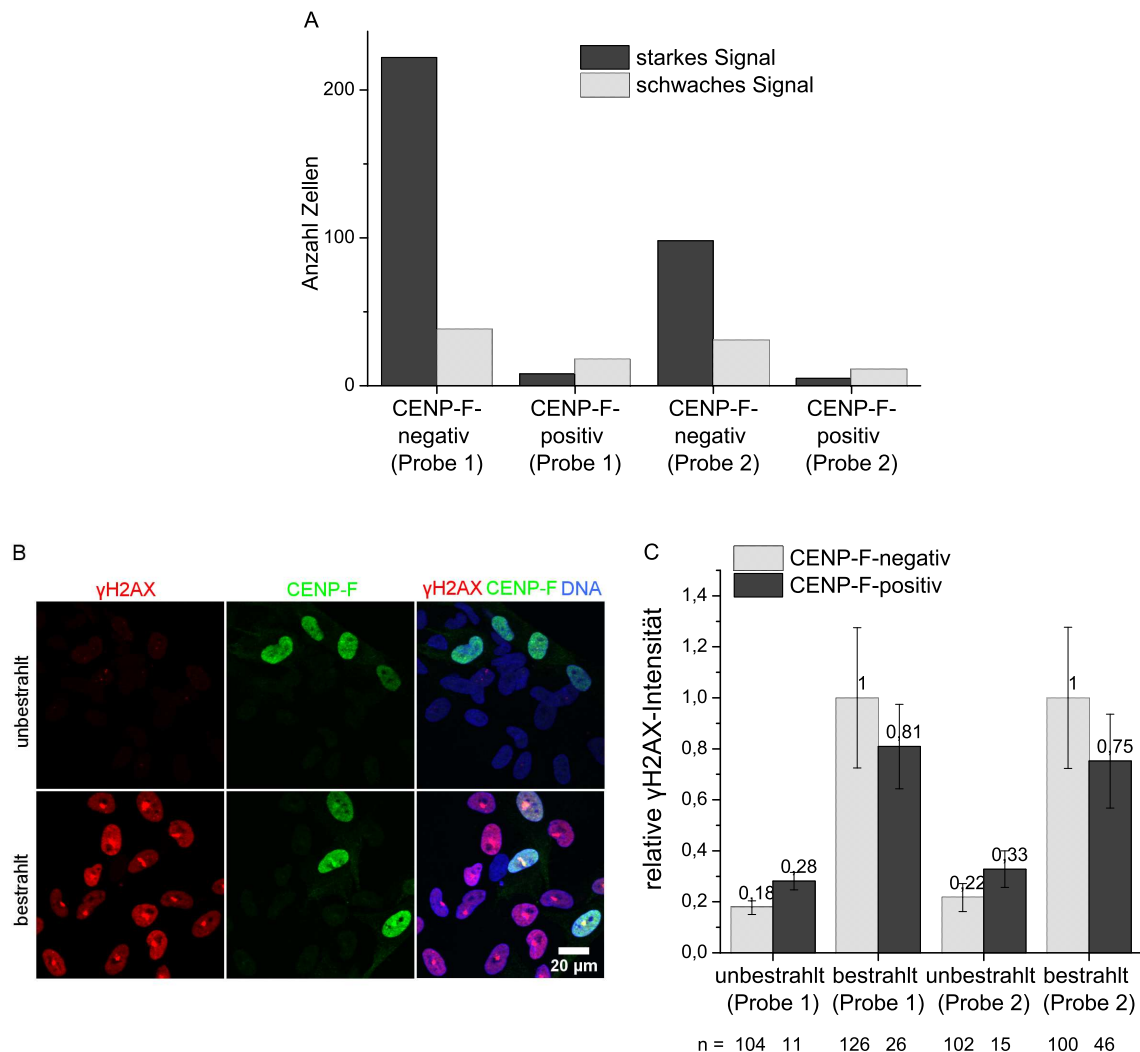
**Abbildung 19: Untersuchung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung nach Bestrahlung des Cytoplasmas und der Zellkerne.** Die Zellkerne von humanen Fibroblasten wurden mittels Hoechstfärbung markiert, von der Software an der Mikrosonde automatisch erkannt und der Bestrahlungsort jeder Zelle markiert (rote Kreuze). Die Zellen wurden mit einem Goldion (12800 keV/ $\mu$ m) (A) 20  $\mu$ m neben dem Zentrum des Zellkerns oder (B) im Zellkern bestrahlt, eine Stunde nach Bestrahlung fixiert und  $\gamma$ H2AX (grün) und die DNA (rot) mit ToPro-3 angefärbt. (C) Das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal wurde quantifiziert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = Anzahl untersuchter Zellen.

#### 4.1.7 Zellzyklusabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung

Wie bereits in Kapitel 4.1.5 beschrieben unterscheidet sich die Intensität des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals zwischen den einzelnen Zellen einer Probe. Die Standardabweichung der gemessenen Intensitäten lag ungefähr zwischen 50 % und 30 % trotz der Bestrahlung jeder Zelle mit einer gleichen Anzahl an Ionen. Ein Einfluss des Zellzyklus auf die Verteilung konnte in diesen Proben weitgehend ausgeschlossen werden, da es sich bei den untersuchten Zellen um konfluente Fibroblasten handelt, die sich hauptsächlich in der G1- bzw. G0-Phase befinden. Dennoch wäre es möglich, dass sich die Intensität des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals zwischen verschiedenen Zellzyklusphasen unterscheidet. Einerseits besitzen G2-Zellen doppelten DNA-Gehalt, so dass mehr DNA-Schäden induziert werden, und auch mehr Histon, das für die Phosphorylierung zur Verfügung steht. Andererseits könnten die für die Phosphorylierung verantwortlichen Enzyme in verschiedenen Zellzyklusphasen unterschiedlich reguliert sein.

Zur Untersuchung der Zellzyklusabhängigkeit wurde in proliferierenden humanen Fibroblasten nach Bestrahlung neben  $\gamma$ H2AX zusätzlich CENP-F angefärbt, das während der späten S- und der G2-Phase exprimiert wird und in der Mitose an die Kinetochore der Chromosomen bindet (Rattner et al., 1993). Nach der Mitose wird CENP-F wieder abgebaut (Liao et al., 1995) und ist daher in der G1-Phase deutlich weniger stark exprimiert als in der G2- und M-Phase oder der späten S-Phase. Für eine erste Abschätzung wurden proliferierende normale humane Fibroblasten mit 40 Kohlenstoffionen (290 keV/ $\mu$ m) pro Zellkern im Punkt an der Mikrosonde bestrahlt und in zwei unabhängigen Proben ausgezählt, wieviele CENP-F-positive und -negative Zellen ein starkes oder schwaches Signal aufweisen. Dabei wurden Zellen, bei der die Beurteilung der Signalstärke sowohl für CENP-F, als auch für  $\gamma$ H2AX nicht eindeutig war, nicht mit in die Auswertung einbezogen (unter 6% der Zellen). Wie in Abb. 20 A gezeigt, waren nach Bestrahlung CENP-F-positive (G2-, M-Phase) Zellen öfter mit einem schwächeren  $\gamma$ H2AX-Signal assoziiert als CENP-F-negative (G1) Zellen.

Da die Anzahl der CENP-F-positiven Zellen in diesen Proben relativ gering war und die Übergänge zwischen den Intensitäten fließend sind, so dass eine Beurteilung der Signalstärke per Auge erschwert ist, sollte eine genauere Quantifizierung des  $\gamma$ H2AX-Signals durch Intensitätsmessung erfolgen. Diese wurde nach Bestrahlung proliferierender humaner Fibroblasten mit 5 Nickelionen (3800 keV/ $\mu$ m) in einen Punkt pro Kern durchgeführt (Abb. 20 B). Wieder wurden Zellen mit einem nicht eindeutig positiven oder negativen CENPF-Signal nicht in der Auswertung berücksichtigt (unter 16% der Zellen). Für eine bessere Vergleichbarkeit der beiden untersuchten, unabhängigen Proben wurden jeweils die gemessenen Werte einer Probe auf die Intensität der CENP-F-negativen bestrahlten Zellen dieser Probe normiert. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität ergab, dass CENP-F-positive Zellen ein leicht verringertes pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX-Signal aufweisen gegenüber CENP-F-negativen Zellen (Abb. 20 C). Bei CENP-F-positiven und -negativen Zellen handelt es sich jedoch nicht um zwei getrennte Populationen was die  $\gamma$ H2AX-Intensität betrifft, da wie in der Immunfluoreszenzfärbung in Abb. 20 B zu sehen ist, in einigen G1-Zellen das  $\gamma$ H2AX-Signal ähnlich schwach wie in G2-Zellen ist. Die Intensitäten der CENP-F-positiven und -negativen Zellpopulation überschneiden sich also. Trotzdem konnte ein leichter Einfluss des Zellzyklus auf die Signalintensität in beiden Versuchen und doppelten Proben festgestellt werden. Um einen Einfluss des Zellzyklus auf die Ergebnisse der folgenden Experimente zu minimieren, wurden in dieser Arbeit alle weiteren Analysen von normalen humanen Fibroblasten bei konfluenter Zelldichte durchgeführt.



**Abbildung 20: Zellzyklusabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung.** (A) In proliferierenden normalen humanen Fibroblasten wurde eine Stunde nach Bestrahlung mit 40 Kohlenstoffionen (290 keV/ $\mu$ m) im Punkt pro Zellkern  $\gamma$ H2AX und CENP-F detektiert. Die Anzahl an CENP-F-negativen und -positiven Zellen mit stärkerem bzw. schwächerem kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signal wurde für zwei unabhängige Proben (1) und (2) ausgezählt. (B) Proliferierende humane Fibroblasten wurden mit 5 Nickelionen (3800 keV/ $\mu$ m) im Punkt pro Zellkern bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung fixiert. Es wurde  $\gamma$ H2AX (rot), CENP-F (grün) und die DNA (blau) mit ToPro-3 angefärbt und (C) das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal in CENP-F-negativen und -positiven Zellen quantifiziert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = Anzahl der untersuchten Zellen.

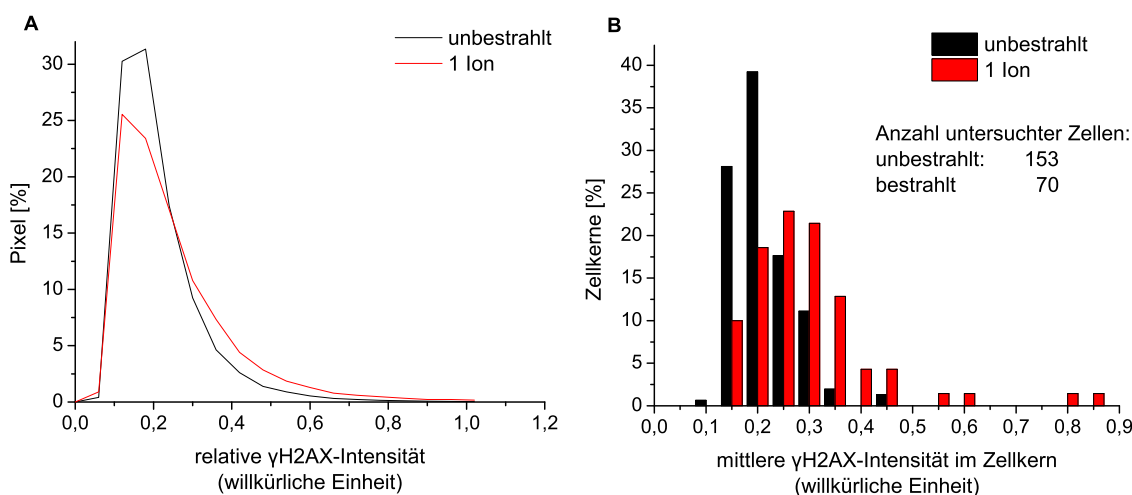
## 4.2 Einfluss von Dosis und Dosisverteilung auf die kernweite Phosphorylierung von H2AX

### 4.2.1 Dosisabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung

Bei der pan-nukleären Phosphorylierung von H2AX handelt es sich um eine Reaktion der Zelle, die bisher nur nach Ionenbestrahlung und nicht nach Röntgenbestrahlung beobachtet werden konnte. Daraus ergab sich die Frage, ob diese Antwort spezifisch nach Ionenbestrahlung auftritt, also nach der Induktion komplexer DNA-Schäden, oder ob es sich um eine generelle Schadensantwort handelt, die aber erst nach Bestrahlung mit hohen lokalen Dosen detektierbar wird. Es wäre vorstellbar, dass die kernweite Antwort erst nach einer bestimmten Schwellendosis induziert wird und



dann nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip verläuft. Es wäre aber auch möglich, dass sich die Stärke der H2AX-Phosphorylierung bei Bestrahlung mit unterschiedlicher Dosis verändert. Um der Klärung dieser Fragestellungen näher zu kommen, wurden humane Fibroblasten an der Mikrosonde mit unterschiedlichen Anzahlen an Kohlenstoffionen (290 keV/ $\mu\text{m}$ ) bestrahlt und das pan-nukleäre  $\gamma\text{H2AX}$ -Signal eine Stunde nach Bestrahlung analysiert. Ein Vergleich der Zusammenfassung der Dosisprofile von unbestrahlten und mit nur einem Kohlenstoffion bestrahlten Zellen zeigt, dass es bereits nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoffion zu einer leichten Veränderung des Intensitätsprofils kommt und sich eine Verschiebung zu mehr Pixeln mit höherer  $\gamma\text{H2AX}$ -Intensität nach Bestrahlung abzeichnet (Abb. 21 A). Hier ist die pan-nukleäre Schadensantwort zwar bereits messbar, per Auge

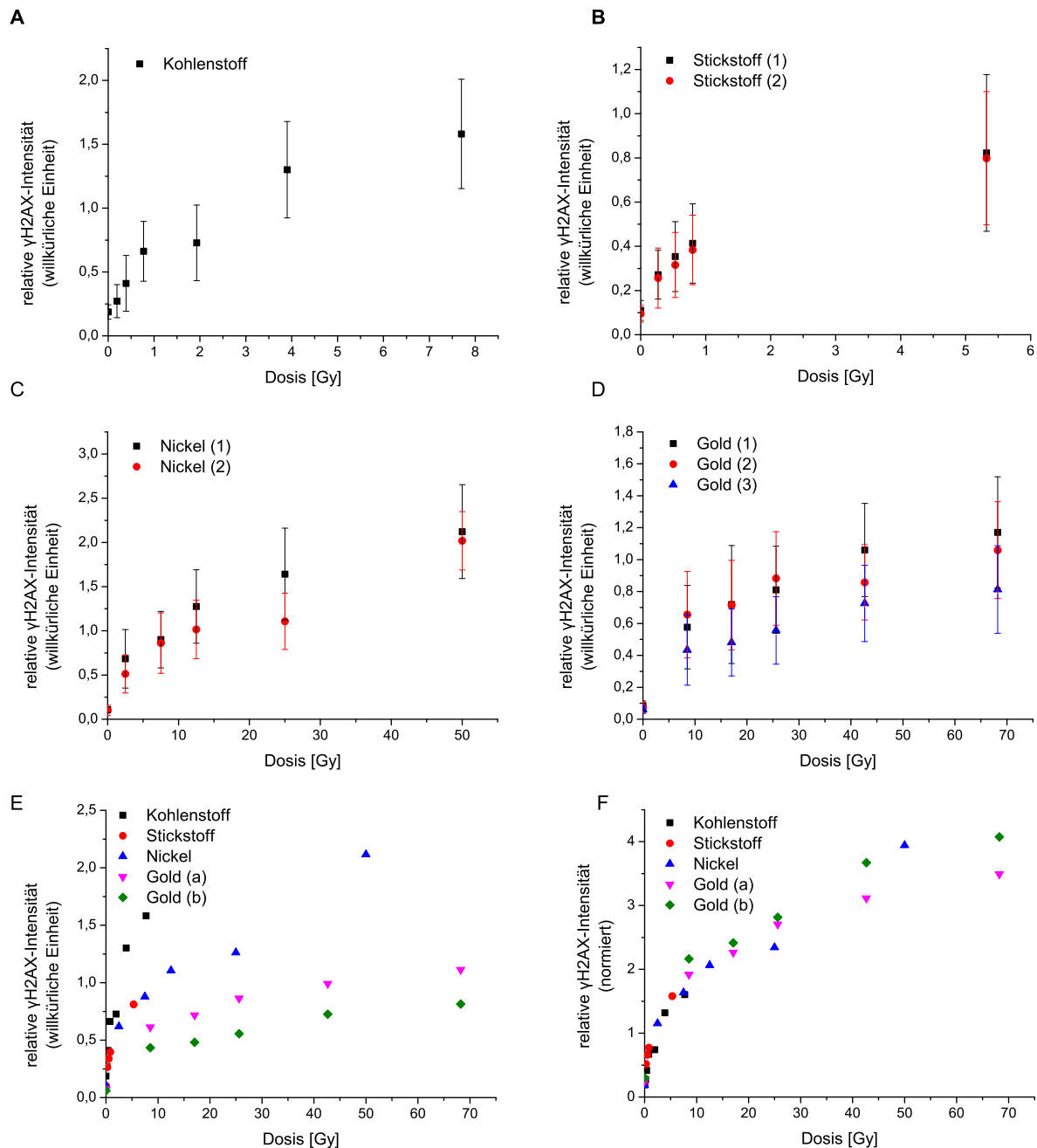


**Abbildung 21: Änderung der  $\gamma\text{H2AX}$ -Intensität nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoffion.** Humane Fibroblasten wurden mit je einem Kohlenstoffion (290 keV/ $\mu\text{m}$ ) pro Zellkern bestrahlt und die Intensität des  $\gamma\text{H2AX}$ -Signals eine Stunde nach Bestrahlung quantifiziert. (A) Es wurden die Intensitätsprofile der untersuchten Zellkerne jeweils einer Aufnahme zusammengefasst und der Prozentsatz an Pixeln, die eine bestimmte Intensität besaßen aufgetragen. B zeigt, in wievielen Zellkernen eine bestimmte Intensität als mittlere Intensität auftrat.

im Mikroskop aber noch nicht erkennbar (Abb. 23). Abb. 21 B zeigt eine Verteilung der mittleren Intensitäten aller Zellkerne und verdeutlicht, dass es nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoffion in den meisten Zellen nur zu einem geringen Anstieg des kernweiten  $\gamma\text{H2AX}$ -Signals kommt, während einzelne Zellen stärker reagieren.

Nach Bestrahlung verschiedener Bestrahlungsfelder innerhalb einer Probe mit unterschiedlichen Anzahlen an Kohlenstoffionen zeigte sich, dass das  $\gamma\text{H2AX}$ -Signal mit zunehmender Anzahl an Kohlenstoffionen ansteigt (Abb. 22 A). Die niedrigste applizierte Dosis liegt mit einem Kohlenstoffion pro Zellkern bei 0,19 Gy, die höchste Dosis mit 40 Kohlenstoffionen pro Zellkern bei 7,7 Gy. Das Signal nimmt mit steigender Dosis zu, steigt jedoch nicht linear an, sondern der Signalanstieg wird bei höheren Dosen langsamer. Es wird deutlich, dass keine Schwellendosis nötig ist, um die kernweite H2AX-Phosphorylierung zu induzieren. Der gemessene Signalanstieg nach Bestrahlung mit nur 2 oder 4 Kohlenstoffionen bestätigt, dass die kernweite Schadensantwort schon bei niedrigen Dosen induziert wird. Im Mikroskop ist das kernweite Signal erst ab der Bestrahlung mit 4 Kohlenstoffionen in einzelnen Zellen sichtbar, bei der Bestrahlung mit 10 Kohlenstoffionen, was einer Dosis von 1,9 Gy entspricht, tritt das kernweite Signal deutlicher hervor (Abb. 23).

Der Anstieg der Schadensantwort im Niedrig-Dosisbereich sollte nochmals bestätigt werden durch Bestrahlung der Zellen mit unterschiedlichen Anzahlen an Stickstoffionen (400 keV/ $\mu\text{m}$ ), da diese

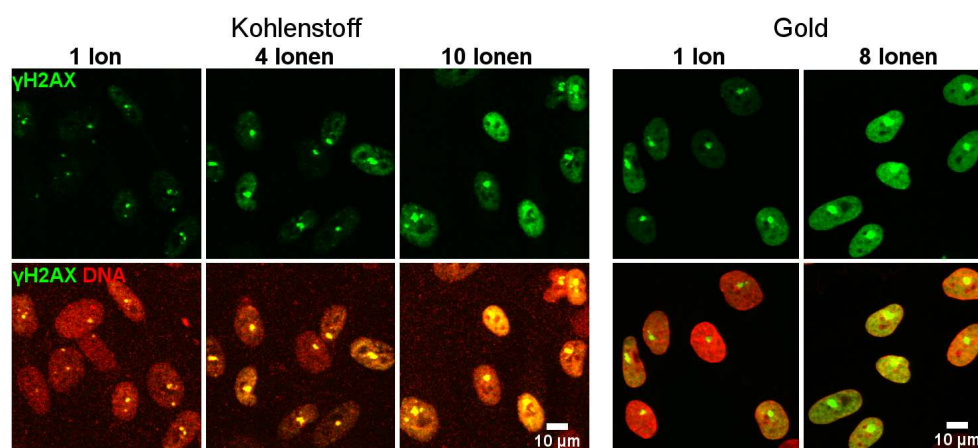


**Abbildung 22: Zunahme des kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signals nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen.** Konfluente humane Fibroblasten wurden mit unterschiedlichen Anzahlen (A) Kohlenstoff- (290 keV/ $\mu$ m), (B) Stickstoff- (400 keV/ $\mu$ m), (C) Nickel- (3800 keV/ $\mu$ m) und (D) Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) bestrahlt und das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal eine Stunde nach Bestrahlung quantifiziert. Es wurden unabhängige Proben (1) und (2) in einer Strahlzeit gemessen, in einer zweiten Gold-Strahlzeit wurde eine weitere Probe (3) gemessen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. Bei der Zusammenfassung aller Experimente (E) wurden zusammengehörige Proben (jeweils 1 und 2) gepoolt, (a) und (b) geben unterschiedliche Strahlzeiten an. Die Intensitätswerte sind zwischen unabhängigen Experimenten nicht direkt miteinander vergleichbar, da für jedes Experiment eigene Einstellungen für die konfokalen Aufnahmen vorgenommen werden mussten. In F wurden für einen Vergleich der Kurvenverläufe die Intensitätswerte wie in Kapitel 3.1.10 beschrieben auf die Höhe der Kohlenstoffintensität normiert.

Ionen ebenfalls einen relativ niedrigen LET besitzen und somit vergleichbar zur Bestrahlung mit Kohlenstoffionen sind. Es wurden zwei unabhängige Proben konfluenter humaner Fibroblasten mit 1, 2, 3 oder 20 Stickstoffionen bestrahlt und das  $\gamma$ H2AX-Signal eine Stunde nach Bestrahlung quantifiziert. Auch hier ist nach Bestrahlung mit einem Stickstoffion, was einer Dosis von 0,27 Gy entspricht, ein deutlicher Signalanstieg im Vergleich zu den unbestrahlten Zellen messbar (Abb. 22 B). Die Steigung des Signalanstiegs im Niedrig-Dosisbereich scheint zwischen 1 und 3 Stickstoffionen linear zu sein, die erreichte Intensität bei Bestrahlung mit 20 Stickstoffionen deutet jedoch auf eine Verringerung der Steigung bei höheren Dosen hin.

Die Beobachtung der beginnenden Abflachung der Kurve nach höheren Dosen Kohlenstoff- und Stickstoffbestrahlung führte zu der Frage, ob es bei hohen Dosen zu einer Sättigung des  $\gamma$ H2AX-Signals kommt. Deswegen wurde der Signalanstieg auch nach Bestrahlung mit höheren Dosen untersucht, wobei mit Ionen höheren LETs bestrahlt wurde. Eine Stunde nach Bestrahlung mit Nickelionen (3800 keV/ $\mu$ m) ist für zwei unabhängige Proben ebenfalls eine stärkere Steigung der Signalzunahme bei niedrigen als bei höheren Dosen zu verzeichnen (Abb. 22 C).

Um den Kurvenverlauf der kernweiten  $\gamma$ H2AX-Antwort nach Bestrahlung mit sehr hohen Dosen zu untersuchen, wurde mit verschiedenen Anzahlen an Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) bestrahlt. So konnte ein Dosisbereich von 8,5 Gy (1 Goldion) bis 68 Gy (8 Goldionen) in zwei unabhängigen Proben (Probe 1 und 2) und einer weiteren Probe in einer anderen Gold-Strahlzeit (Probe 3) untersucht werden. Die Messung zeigt, dass das Signal auch nach Bestrahlung mit sehr hohen Dosen noch ansteigt, ohne jedoch ein Plateau zu erreichen (Abb. 22 D). Auch nach Bestrahlung mit 8 Goldionen pro Zellkern war das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal noch nicht so stark wie das Signal an den Foci (Abb. 23), was gegen eine Sättigung der Phosphorylierung spricht. Abb. 22 E zeigt eine Zusammenfas-



**Abbildung 23: Das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal nach Bestrahlung mit steigenden Anzahlen Kohlenstoff- bzw. Goldionen.** Humane Fibroblasten wurden mit 1, 4 oder 10 Kohlenstoffionen (290 keV/ $\mu$ m) oder 1 oder 8 Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) im Punkt bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung fixiert.  $\gamma$ H2AX (grün) wurde durch Immunfluoreszenzfärbung markiert und die DNA (rot) wurde mit ToPro-3 gefärbt.

sung aller Experimente, bei denen die Messwerte zusammengehöriger Proben vereinigt wurden. Da die Messungen aber nach unterschiedlichen Strahlzeiten stattfanden, die Proben also mit unterschiedlichen Färbelösungen gefärbt waren und jeweils eigene Einstellungen für die Aufnahmen am konfokalen Mikroskop gewählt werden mussten, sind die absoluten Messwerte verschiedener Experimente nicht direkt miteinander vergleichbar. Es wird jedoch deutlich, dass die Dosisabhängigkeit der kernweiten Antwort über einen weiten Dosisbereich gegeben ist und dass der Signalanstieg bei

niedrigeren Dosen pro Dosisseinheit stärker zu sein scheint als bei höheren Dosen.

Desweiteren stellte sich die Frage, ob die Stärke der kernweiten H2AX-Phosphorylierung auch vom LET also der Komplexität des induzierten DNA-Schadens abhängt. Da es sich bei der kernweiten Phosphorylierung von H2AX um einen Prozess handelt, der erst nach Ionenbestrahlung deutlich sichtbar wird, wäre eine LET-Abhängigkeit für die pan-nukleäre Antwort denkbar. Da es jedoch an der Beschleunigeranlage nicht möglich war, Zellen mit Ionen unterschiedlichen LETs parallel zu bestrahlen, konnte kein direkter Vergleich zwischen Bestrahlung mit verschiedenen Ionen durchgeführt werden. Als Annäherung an diese Fragestellung sollte jedoch überprüft werden, ob sich ein ähnlicher Kurvenverlauf der kernweiten Antwort mit steigender Dosis für die verschiedenen Ionen ergibt. Deswegen wurden die gemessenen Kurven auf die Höhe der Kohlenstoffkurve normiert wie in Kapitel 3.1.10 beschrieben. Es zeigte sich, dass die Dosis-Effekt-Kurven einem ähnlichen Verlauf folgen könnten (Abb. 22 F). Dies würde dafür sprechen, dass die kernweite Antwort nicht vom LET abhängt, jedoch wären für eine eindeutige Aussage noch weitere direkte Nachweise nötig.

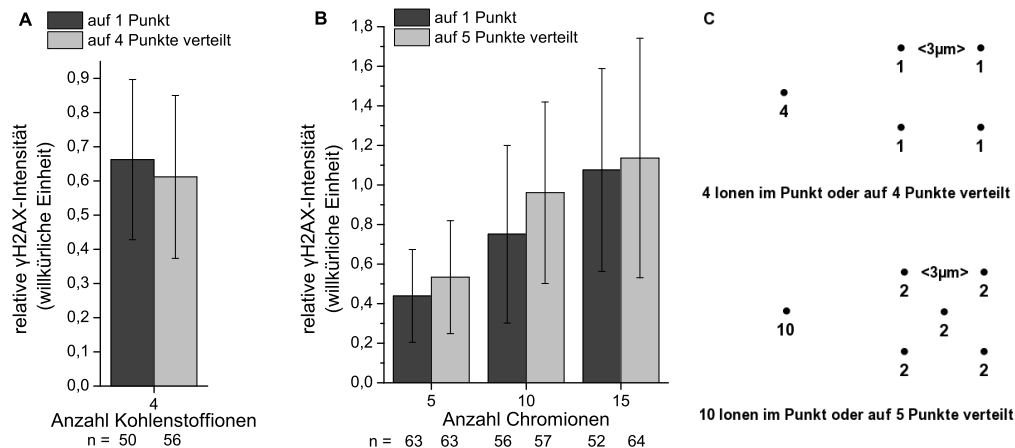
#### **4.2.2 Einfluss der Dosisverteilung auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung**

Bei der Quantifizierung des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals wurden mit Hilfe der Mikrosonde mehrere Ionen in einen Punkt im Zellkern gezielt. So wurde beispielsweise bei der Untersuchung der Dosisabhängigkeit der kernweiten Antwort mit bis zu 40 Kohlenstoffionen im Punkt bestrahlt. Es wird jedoch erwartet, dass sich die Ionenspuren meistens nur am Rand überlagern, nicht jedoch die Zentren der Ionenspuren. Bei Bestrahlung mit der Mikrosonde mit mehreren Ionen in einen Punkt liegen alle Treffer in einer Fläche von  $\varnothing$  600 nm (Voss et al., 2011). Bei den verwendeten Energien an der Mikrosonde (4.8 MeV/u) wird der Hauptanteil der Dosis im Nanometerbereich um das Zentrum der Ionenspur herum deponiert (vergleiche Abb. 3). Doch auch mehrere hundert Nanometer von der Ionenspur entfernt wird noch eine geringere Dosis deponiert. Mit der Bestrahlung im Punkt ergeben sich wahrscheinlich überlappende Bereiche an den Rändern der Ionenspur, an denen die Dosis aufsummiert wird. Es sollte daher überprüft werden, ob durch diese Bestrahlungsmethode, also die räumliche Nähe mehrerer Ionenspuren die kernweite Phosphorylierung von H2AX beeinflusst wird.

Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden zunächst humane Fibroblasten mit 4 Kohlenstoffionen (290 keV/  $\mu$ m) bestrahlt. Dabei wurden die 4 Ionen in verschiedenen Bestrahlungsfeldern innerhalb einer Probe entweder in einen Punkt in den Zellkern gezielt oder mit einem Abstand von 3  $\mu$ m nebeneinander gezielt, so dass sie das Muster eines Quadrats bildeten (Abb. 24 C). Es wurde zuerst ein Ion mit relativ geringem LET gewählt und nur mit wenigen Ionen bestrahlt, da hier der Signalanstieg pro Dosisseinheit noch stärker ist als nach Bestrahlung mit höheren Dosen und deshalb ein möglicher Unterschied durch verschiedene Dosisverteilungen leichter detektierbar sein könnte. Die Messung des kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signals eine Stunde nach Bestrahlung ergab in diesem Fall jedoch keinen deutlichen Unterschied (Abb. 24 A).

Da die kernweite Antwort nach Bestrahlung mit 4 Kohlenstoffionen noch relativ gering ausfällt, sollte der Versuch mit einem Ion höheren LETs wiederholt werden und die Anzahl der Ionen erhöht werden, um einen möglichen Effekt zu verstärken. Dazu wurden U2OS Zellen in verschiedenen Bestrahlungsfeldern einer Probe mit 5, 10 oder 15 Chromionen (3000 keV/  $\mu$ m) im Punkt bestrahlt oder die gleiche Anzahl an Ionen auf 5 Punkte im Zellkern verteilt (Abb. 24 C), so dass sie das Muster

eines Kreuzes bildeten. Die Messungen der kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signale ergaben, dass kein klarer Unterschied in der Schadensantwort zwischen den untersuchten Dosisverteilungen besteht (Abb. 24 B). Ein Einfluss der räumlichen Verteilung der Treffer auf die pan-nukleäre H2AX-Phosphorylierung kann also weitgehend ausgeschlossen werden.



**Abbildung 24: Untersuchung der pan-nukleären H2AX-Phosphorylierung nach unterschiedlicher Dosisverteilung.** Es wurden konfluente humane Fibroblasten (A) mit 4 Kohlenstoffionen (290 keV/ $\mu$ m) bestrahlt, wobei die Ionen entweder in einen Punkt oder auf vier einzelne Punkte in den Zellkern gezielt wurden oder (B) U2OS Zellen mit verschiedenen Anzahlen Chromosomen (3000 keV/ $\mu$ m) bestrahlt, wobei die Ionen ebenfalls entweder in einen Punkt gezielt oder auf 5 Punkte verteilt wurden. Die Zellen wurden eine Stunde nach Bestrahlung fixiert,  $\gamma$ H2AX durch Immunfluoreszenzfärbung markiert und das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal quantifiziert. (C) Zeigt schematisch die Bestrahlungsmuster bei Bestrahlung mit 4 Ionen im Punkt oder 4 einzelnen Ionen und 10 Ionen im Punkt gegenüber 10 Ionen auf 5 Punkte verteilt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = Anzahl untersuchter Zellen.

### 4.3 Zeitabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung

Die kernweite H2AX-Phosphorylierung wird wie die H2AX-Phosphorylierung an den DNA-Schäden durch Bestrahlung mit Ionen also durch den gleichen Prozess ausgelöst. Es stellte sich daher die Frage, ob beide Phosphorylierungen auch zum selben Zeitpunkt induziert werden und der gleichen Kinetik folgen. Für die  $\gamma$ H2AX-Foci kommt es bei einsetzender Reparatur zur Rückbildung des  $\gamma$ H2AX-Signals, wobei mit steigender Komplexität der DNA-Schäden die Reparatur verlangsamt ist (Shibata et al., 2011). Über den zeitlichen Verlauf der kernweiten Antwort hingegen war bisher noch nichts bekannt. Da jedoch die pan-nukleäre Phosphorylierung nicht von der räumlichen Nähe zu DSBs abhängig ist, wäre nicht unbedingt zu erwarten, dass beide Phosphorylierungsvorgänge die gleiche Kinetik aufweisen. Da die Regulierung der kernweiten Phosphorylierung zunächst noch vollständig ungeklärt war, konnte auch eine weitere Zunahme des Signals zu späteren Zeitpunkten nicht ausgeschlossen werden.

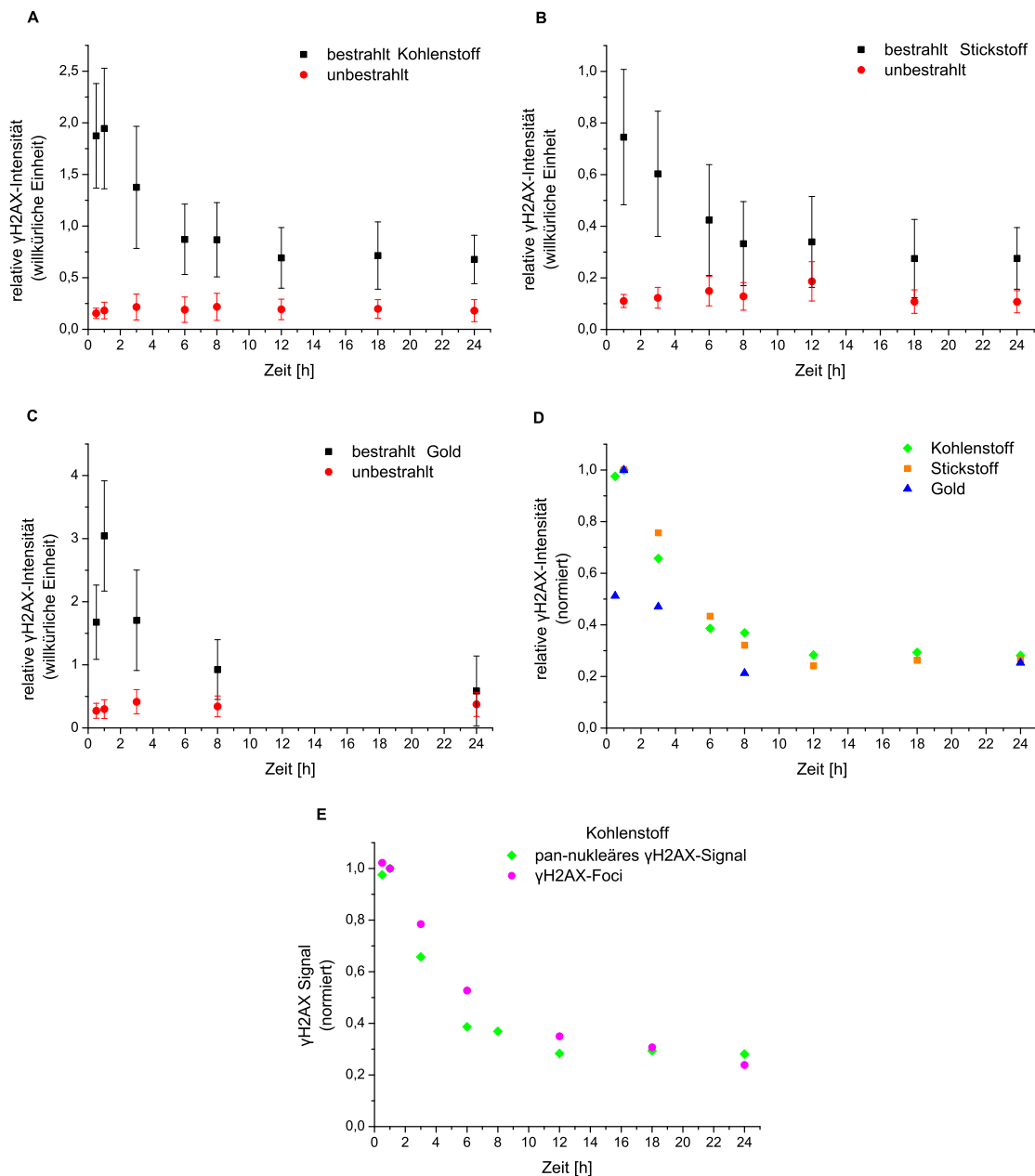
Um den zeitlichen Verlauf der kernweiten Antwort zu untersuchen, wurde die Intensität des  $\gamma$ H2AX-Signals zu verschiedenen Zeitpunkten bis 24 Stunden nach Bestrahlung von humanen Fibroblasten mit 40 Kohlenstoffionen (290 keV/ $\mu$ m) pro Zellkern quantifiziert. Es wurde mit einer so hohen Anzahl an Kohlenstoffionen bestrahlt, da sicher gestellt sein sollte, dass trotz des relativ niedrigen LETs ein deutliches pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX-Signal induziert werden würde. Die Messungen zeigen, dass innerhalb der ersten Stunde nach Bestrahlung die Phosphorylierung von H2AX ansteigt und ungefähr bei einer Stunde einen maximalen Wert erreicht (Abb. 25 A). Innerhalb der nächsten 6 bis 8 Stunden

bildet sich das Signal stark zurück, bleibt dann auf einem niedrigen Niveau bis 24 nach Bestrahlung.

Es sollte die Kinetik von pan-nukleärem  $\gamma$ H2AX mit der Kinetik der  $\gamma$ H2AX-Foci direkt innerhalb einer Probe verglichen werden. Dazu wurden die Zellen mit Stickstoffionen (400 keV/ $\mu$ m) bestrahlt, da bei niedrigerem LET weniger DSBs pro Focus vorhanden sind und so die Reparatur genauer gemessen werden kann. Es wurden 10 Ionen in einen Punkt gezielt, um eine genügend hohe Dosis zu applizieren, um eine deutlich messbare kernweite H2AX-Phosphorylierung zu induzieren und vier einzelne Ionen um den zentralen Treffer gezielt, um die Reparatur über die Zeit anhand der einzelnen Treffer zu ermitteln. Es wurde also mit insgesamt 14 Ionen bestrahlt (3,8 Gy). Allerdings war die Quantifizierung der  $\gamma$ H2AX-Foci wegen einem Auseinanderdriften der Foci aus dem zentralen Punkt mit 10 Ionentreffern zu späteren Zeitpunkten nicht möglich. Allerdings wurde das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal quantifiziert (Abb. 25 B). Auch hier kommt es ähnlich wie nach Kohlenstoffbestrahlung zu einem Rückgang des kernweiten Signals innerhalb der ersten 8 Stunden nach Bestrahlung. Es sollte überprüft werden, ob die Kinetik der kernweiten H2AX-Phosphorylierung von der Komplexität der DNA-Schäden abhängt. Dazu wurden humane Fibroblasten mit Goldionen bestrahlt, die mit 12800 keV/ $\mu$ m einen sehr viel höheren LET besitzen als Kohlenstoffionen mit 290 keV/ $\mu$ m oder Stickstoffionen mit 400 keV/ $\mu$ m und damit DNA-Schäden erzeugen, für die eine deutlich langsamere Reparatur erwartet werden kann. Die Zellkerne wurden mit jeweils 2 Goldionen bestrahlt, so dass nicht nur der LET, sondern auch die applizierte Dosis mit 17 Gy höher war als nach Kohlenstoff- (7,7 Gy) und Stickstoffbestrahlung (3,8 Gy). Auch hier kommt es nach Bestrahlung zunächst zu einem Signalanstieg innerhalb der ersten Stunde, gefolgt von einem raschen Rückgang der Phosphorylierung innerhalb von 8 Stunden (Abb. 25 C). Nach 24 Stunden ist auch hier das verbleibende Signal erhöht gegenüber den unbestrahlten Zellen. In Abb. 25 D wurden die Kinetiken der drei Experimente direkt miteinander verglichen. Dazu wurden für jeden Zeitpunkt die Intensitätswerte des  $\gamma$ H2AX-Signals der unbestrahlten Kontrollen von den Werten der bestrahlten Zellen abgezogen. Alle so erhaltenen Werte eines Experiments wurden auf die Intensität bei einer Stunde normiert. Es zeigt sich, dass die Kinetiken für alle Experimente trotz des unterschiedlichen LETs sehr ähnlich sind, wobei der Rückgang des Signals nach Goldbestrahlung sogar etwas schneller erscheint als nach Kohlenstoff- und Stickstoffbestrahlung. Nach 24 Stunden ist in allen drei Fällen ein ähnlicher Prozentsatz an kernweisem Signal vorhanden, bei Bestrahlung mit Kohlenstoffionen 28 %, mit Stickstoffionen 27 % und nach Goldbestrahlung 25 %.

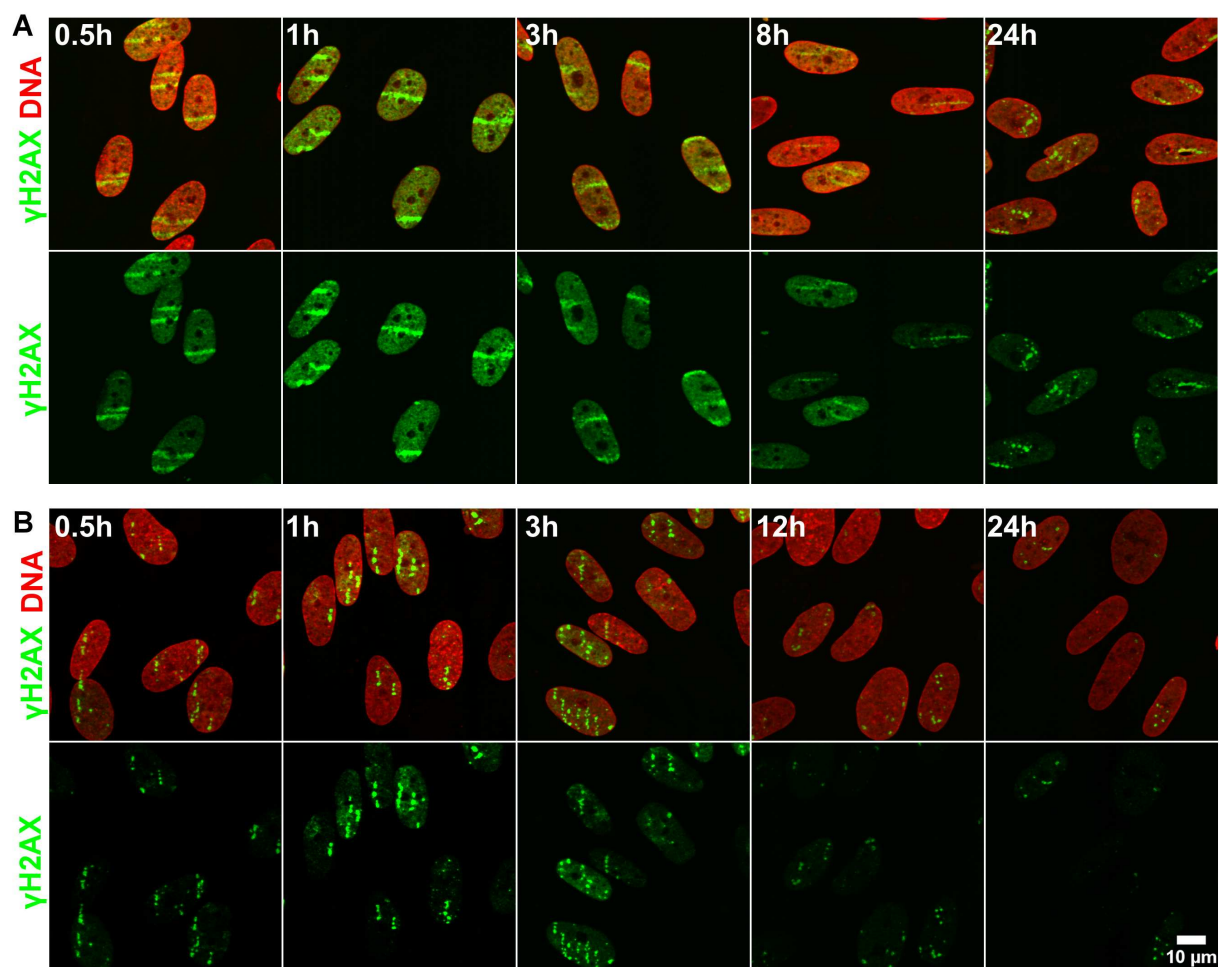
Um einen Vergleich der Kinetik des kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signals mit der Kinetik der  $\gamma$ H2AX-Foci zu ermöglichen, wurden humane Fibroblasten schräg mit Kohlenstoffionen bestrahlt (170 keV/ $\mu$ m) und die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci über die Zeit bestimmt. Die mittlere Foci-Anzahl lag in unbestrahlten Zellen bei 0,8 Foci/Zellkern, eine Stunde nach Bestrahlung bei 13 Foci/Zellkern. Zur besseren Vergleichbarkeit wurden auch hier die Anzahlen der Foci nach Abzug der unbestrahlten Kontrolle auf den Wert bei einer Stunde normiert. Abb. 25 E zeigt den direkten Vergleich zwischen der Kinetik des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals und der  $\gamma$ H2AX-Foci. In beiden Fällen kommt es über mehrere Stunden nach Bestrahlung zu einer ähnlichen Rückbildung des Signals. Die Kinetik des kernweiten Signals scheint jedoch etwas schneller zu sein, obwohl die applizierte Dosis hier durch Bestrahlung mit 40 Ionen und den leicht erhöhten LET an der Mikrosonde mit 7,7 Gy höher ist als bei der für die Foci-Kinetik durchgeführten ungezielten Bestrahlung mit 0,8 Gy.

Die kernweite Phosphorylierung von H2AX wird also offenbar durch die Entstehung von komplexen



**Abbildung 25: Vergleich der Kinetik des kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signals nach Bestrahlung mit Kohlenstoff-, Stickstoff- und Goldionen und Vergleich mit der Kinetik der  $\gamma$ H2AX-Foci.** Das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal wurde in humanen Fibroblasten zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung quantifiziert. Es wurde entweder mit (A) 40 Kohlenstoffionen (290 keV/ $\mu$ m) im Punkt, (B) 14 Stickstoffionen (400 keV/ $\mu$ m, Bestrahlungsmuster: 10 im Punkt + 4 einzelne Ionen) oder (C) 2 Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) im Punkt pro Zellkern bestrahlt. (D) Für A, B und C wurden die Intensitäts-Werte der unbestrahlten Kontrollen von den Werten der bestrahlten Zellen abgezogen und alle Werte eines Experiments auf die jeweilige Intensität nach einer Stunde normiert. (E) Die Kinetik des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals nach Kohlenstoffbestrahlung (290 keV/ $\mu$ m) wurde mit der Kinetik der  $\gamma$ H2AX-Foci nach schräger Bestrahlung mit Kohlenstoffionen (170 keV/ $\mu$ m,  $3 \cdot 10^6$  T/cm<sup>2</sup>) verglichen. In beiden Fällen wurden alle Werte auf den Wert bei einer Stunde normiert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

DNA-Schäden induziert, wird jedoch unabhängig von der Dosis oder dem LET nicht lange aufrecht erhalten. Die Rückbildung der Phosphorylierung erfolgt in einem Zeitraum, in dem man besonders für den sehr hohen LET von Goldionen (12800 keV/ $\mu\text{m}$ ) keine gleichwertig schnelle Reparatur der komplexen DNA-Schäden erwarten kann. Da jedoch eine Auszählung von einzelnen  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci nach Bestrahlung mit Goldionen sehr schwierig ist, sollte im Mikroskop untersucht werden, wie sich das  $\gamma\text{H2AX}$ -Signal an der Ionenspur über die Zeit verändert. Dazu wurden humane Fibroblasten seitlich mit Goldionen bestrahlt und das  $\gamma\text{H2AX}$ -Signal zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung detektiert. Die Aufnahmen des Immunfluoreszenzsignals zu verschiedenen Zeitpunkten sind für die Gold- und Kohlenstoffbestrahlung in Abb. 26 gezeigt. Während nach Kohlenstoffbestrahlung ein starker Rückgang der  $\gamma\text{H2AX}$ -Foci nach 12 Stunden zu verzeichnen ist (Abb. 26 B), findet nach Goldbestrahlung zwar zu späten Zeitpunkten eine Strukturierung der Ionenspur statt, sie bleibt aber auch nach 24 Stunden deutlich sichtbar (Abb. 26 A). Der Rückgang des Foci-Signals ist also nach Kohlenstoffbestrahlung schneller als nach Goldbestrahlung, während die Kinetik des kernweiten  $\gamma\text{H2AX}$ -Signals für beide Bestrahlungen ähnlich ist.



**Abbildung 26: Vergleich des  $\gamma\text{H2AX}$ -Signals an der Ionenspur zu verschiedenen Zeitpunkten nach Bestrahlung mit Kohlenstoff- und Goldionen.** Es wurden humane Fibroblasten seitlich mit (A) Gold- (12800 keV/ $\mu\text{m}$ ) oder (B) Kohlenstoffionen (170 keV/ $\mu\text{m}$ ) bestrahlt. Die Fluenz betrug für beide Experimente  $3 \cdot 10^6$  T/cm<sup>2</sup>. Die Zellen wurden zu verschiedenen Zeiten nach Bestrahlung fixiert und  $\gamma\text{H2AX}$  (grün) und die DNA mit To-Pro3 (rot) gefärbt.



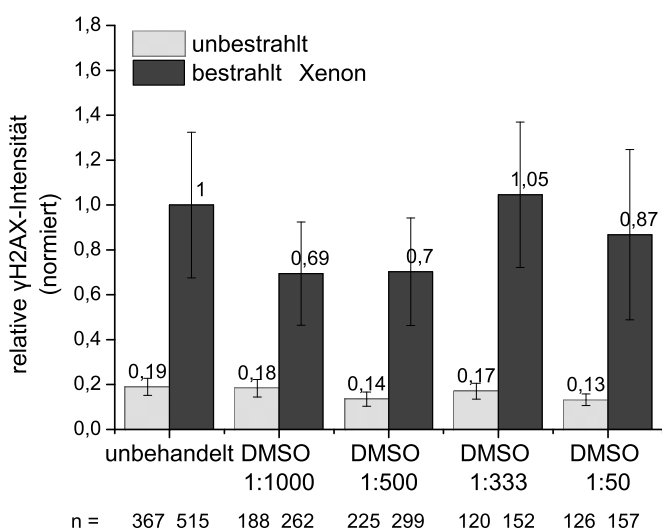
## 4.4 Kinaseabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung

### 4.4.1 Untersuchung des pan-nukleären $\gamma$ H2AX-Signals nach Inhibition von DNA-PK und ATM

Die kernweite Schadensantwort nach Ionenbestrahlung könnte vermutlich sowohl durch eine kernweite Strukturveränderung des Chromatins induziert werden, als auch durch eine mögliche Diffusion von kurzen DNA-Fragmenten, die durch das Auftreten von DSBs in räumlicher Nähe entstehen könnten. Für ATM wurde beschrieben, dass es durch Chromatinstrukturveränderungen aktiviert werden kann (Bakkenist und Kastan, 2003) und DNA-Fragmente könnten vor allem DNA-PK aktivieren (Quanz et al., 2009b), während ATR an einzelsträngige DNA-Bereiche rekrutiert wird, die mit RPA beladen sind (Zou und Elledge, 2003). Um einen Hinweis auf die Regulierung der kernweiten Schadensantwort nach Ionenbestrahlung zu erhalten, sollte untersucht werden, welche der Kinasen nach Ionenbestrahlung für die kernweite Phosphorylierung von H2AX verantwortlich ist.

Dafür wurden humane Fibroblasten mit spezifischen Inhibitoren von ATM bzw. DNA-PK, die in DMSO gelöst waren, behandelt. Zunächst sollte ein möglicher Einfluss von DMSO auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung untersucht werden, da DMSO mit Hydroxylradikalen reagiert

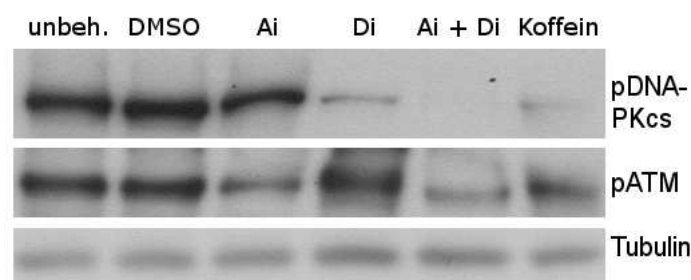
(Ashwood-Smith, 1975), die bei Ionenbestrahlung entstehen und zur Schädigung der DNA beitragen. Durch DMSO-Behandlung könnte also die durch Ionenbestrahlung induzierte Beschädigung der DNA verringert werden. Die Verdünnung von DMSO 1:1000 entspricht der Behandlung mit ATM Inhibitor, 1:500 der mit DNA-PK Inhibitor, 1:333 der Behandlung mit beiden Inhibitoren zusammen. Zusätzlich wurde mit der DMSO Verdünnung von 1:50 der Einfluss einer sehr hohen DMSO-Konzentration untersucht, um einen möglichen Effekt der Behandlung zu verdeutlichen. Es zeigte sich nach Bestrahlung mit 3 Xenonionen pro Zellkern (9300 keV/ $\mu$ m), dass verschiedene DMSO-Konzentrationen die H2AX-Phosphorylierung nicht beeinflussen (Abb. 27). Während das



**Abbildung 27: Untersuchung der H2AX-Phosphorylierung nach Xenonbestrahlung bei Inkubation mit verschiedenen DMSO-Konzentrationen.** Humane Fibroblasten wurden mit verschiedenen Verdünnungen DMSO eine Stunde vor bis eine Stunde nach Bestrahlung inkubiert, mit 3 Xenonionen (9300 keV/ $\mu$ m) pro Zellkern bestrahlt und die Intensität des kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signals gemessen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = Anzahl untersuchter Zellen.

kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal nach Behandlung mit niedrigen Konzentrationen (1:1000 und 1:500) aber auch nach Behandlung mit der höchsten DMSO-Konzentration (1:50) unter der Signal-Intensität der unbehandelten, bestrahlten Kontrolle lag, wurde bei der Verdünnung 1:333 ein ähnliches Signal wie in der Kontrolle gemessen. Die beobachtete Schwankung zwischen den verschiedenen Proben von 17 % entspricht dem in Kapitel 4.1.5 ermittelten Fehler zwischen gleich behandelten Proben.

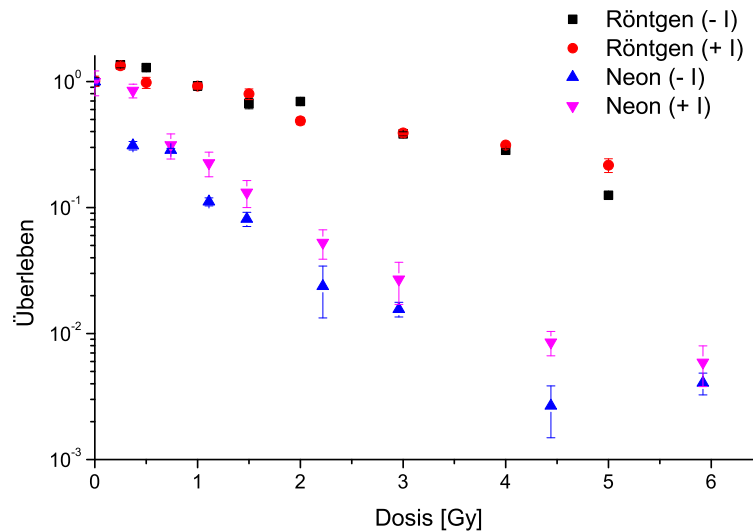
Es sollte mittels Western Blot Analyse untersucht werden, ob der verwendete ATM- (KU55933) und DNA-PK-Inhibitor (IC86621) sowie Koffein geeignet sind, um die Aktivierung von ATM und DNA-PK zu unterdrücken. Dazu wurden humane Fibroblasten mit den entsprechenden Inhibitoren eine Stunde vor der Bestrahlung mit 10 Gy Kohlenstoffionen (170 keV/ $\mu\text{m}$ ) inkubiert und auch bis zur Herstellung der Proteinlysate eine Stunde nach Bestrahlung weiter mit den Inhibitoren behandelt. Als Kontrolle zum Koffein wurde eine unbehandelte Probe mitgeführt und zum Vergleich mit den Inhibitoren eine mit DMSO behandelte Probe. Die DMSO-Konzentration entsprach dabei der Konzentration bei Behandlung mit beiden Inhibitoren zusammen. Die Menge der phosphorylierten Formen von ATM (pS1981) und DNA-PKcs (pS2056) wurde im Western Blot überprüft, sowie Tubulin als



**Abbildung 28: Überprüfung der Wirkung der PIKK-Inhibitoren mittels Western Blot nach Ionenbestrahlung.** Eine Stunde nach Bestrahlung von humanen Fibroblasten mit 10 Gy Kohlenstoffionen (170 keV/ $\mu\text{m}$ ) wurden Zell-Lysate hergestellt. Die Zellen waren eine Stunde vor Bestrahlung bis zur Zellernte eine Stunde nach Bestrahlung mit DMSO oder ATM-Inhibitor (Ai), DNA-PK-Inhibitor (Di), beiden Inhibitoren (Ai + Di) oder Koffein behandelt oder waren nicht behandelt (unbeh.). Es wurden die Mengen pDNA-PKcs (S2056) oder pATM (S1981) mittels Western Blot Analyse untersucht. Tubulin wurde als Kontrolle der geladenen Proteinmengen detektiert.

Kontrolle der geladenen Proteinmengen detektiert (Abb. 28). Die Autophosphorylierung der Kinasen kann durch Verwendung der jeweiligen Inhibitoren verringert werden, wobei jeweils noch ein Restsignal der phosphorylierten Formen der Kinasen detektierbar ist. Die Behandlung der Zellen mit Koffein scheint auf die Aktivierung von DNA-PK einen größeren Einfluss zu haben, als auf die Aktivierung von ATM.

Da die Inaktivierung von ATM und DNA-PK eine stark strahlensensitivierende Wirkung hat, könnte die Behandlung mit ATM- und DNA-PK-Inhibitoren eine starke Stresssituation in den Zellen auslösen, die die untersuchte kernweite Strahlenantwort überlagern könnte. Deswegen sollte ein möglicher zytotoxischer Einfluss der kurzzeitigen Inhibition von ATM und DNA-PK analysiert werden. Dafür wurde die Koloniebildungsfähigkeit der Zellen nach Behandlung mit Inhibitoren und nach Bestrahlung mit verschiedenen Dosen Röntgenstrahlen und Neonionen (460 keV/ $\mu\text{m}$ ) gemessen. Es wurden konfluente Fibroblasten eine Stunde vor Bestrahlung mit beiden Inhibitoren gleichzeitig inkubiert. Der Inhibitor blieb bis eine Stunde nach Bestrahlung im Zellmedium, was dem Zeitpunkt der meisten der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen der Kinaseabhängigkeit des pan-nukleären  $\gamma\text{H2AX}$ -Signals entspricht. Die Zellen wurden zur Untersuchung der Koloniebildungsfähigkeit geerntet, neu eingesät und nach zweiwöchiger Inkubation im Brutschrank mit normalem Medium analysiert. Wie erwartet war das Überleben der Zellen nach Bestrahlung mit Neonionen deutlich mehr eingeschränkt als nach Bestrahlung mit gleichen Dosen Röntgenstrahlen. Nach Bestrahlung mit Neonionen war bereits bei einer Dosis von 1,5 Gy das Überleben auf ungefähr 10 % reduziert, während bei gleicher Dosis nach Röntgenbestrahlung noch ungefähr 70 % der Zellen überlebten (Abb. 29). Allerdings führte die kurzzeitige Behandlung mit den beiden Inhibitoren zu



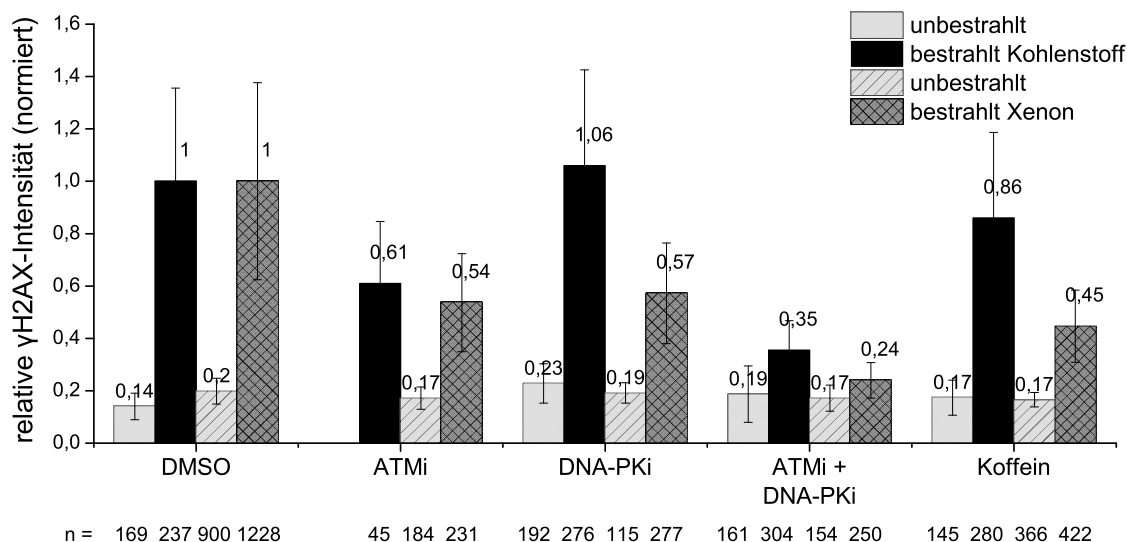
**Abbildung 29: Überprüfung der Zytotoxizität der kurzzeitigen Behandlung mit ATM- und DNA-PK-Inhibitor.** Humane Fibroblasten wurden eine Stunde vor bis eine Stunde nach Bestrahlung mit ATM- und DNA-PK-Inhibitor (+ I) oder DMSO (- I) inkubiert. Die Zellen wurden entweder mit unterschiedlichen Dosen Röntgenstrahlen oder mit Neonionen (460 keV/ $\mu$ m) bestrahlt und die Koloniebildungsfähigkeit überprüft. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung zwischen 3 Proben.

keinem eindeutigen Unterschied der Koloniebildungsfähigkeit im Vergleich zu den kontrollbehandelten Zellen. Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Inhibitoren reversibel wirken und kein deutlicher zytotoxischer Effekt durch die kurzzeitige Behandlung konfluenten humanen Fibroblasten mit beiden Inhibitoren entsteht.

Im Weiteren sollte überprüft werden, wie das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal durch Behandlung der Zellen mit den PIKK-Inhibitoren beeinflusst wird. Es wurden humane Fibroblasten mit ATM-Inhibitor, DNA-PK-Inhibitor, mit beiden Inhibitoren oder dem unspezifischen PIKK-Inhibitor Koffein behandelt. Die Zellen wurden mit 3 Xenonionen (9300 keV/ $\mu$ m, 18,3 Gy) oder 40 Kohlenstoffionen (290 keV/ $\mu$ m, 7,7 Gy) pro Zellkern bestrahlt und eine Stunde später das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal untersucht. Für die DMSO-Kontrolle wurden die Messwerte für die Verdünnungen 1:1000, 1:500 und 1:333 und die unbehandelte Kontrolle zusammengefasst (bei Xenonbestrahlung) bzw. nur die Verdünnung entsprechend der Doppelinhibition verwendet (bei Kohlenstoffbestrahlung). Für eine bessere Vergleichbarkeit der Ergebnisse beider Strahlzeiten wurden die Werte der DMSO-behandelten Zellen nach Bestrahlung jeweils auf 1 gesetzt. Nach Inhibition von ATM oder DNA-PK fand nach Ionenbestrahlung eine kernweite H2AX-Phosphorylierung statt. Die Inhibition der einzelnen Kinasen führte jedoch bereits zu einer Reduktion des Signals auf ca. 60 % im Vergleich zur DMSO-Kontrolle, nach Bestrahlung mit Kohlenstoffionen wurde bei DNA-PK-Inhibition die  $\gamma$ H2AX-Intensität hingegen nicht reduziert (Abb. 30). Die gleichzeitige Inhibition beider Kinasen führte jedoch zu einer Unterdrückung der Schadensantwort nahe dem Kontroll-Niveau. Auch die Koffein-Behandlung führte zu einer schwächeren Reduktion des Signals auf 45 % nach Xenon- bzw. 86 % nach Kohlenstoffbestrahlung. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass nicht eine Kinase alleine die kernweite Phosphorylierung von H2AX induziert, sondern dass sowohl ATM, als auch DNA-PK an der Schadensantwort beteiligt sind.

Um diese Ergebnisse weiter zu bestätigen, sollte in ATM- und DNA-PK-defizienten Zelllinien un-

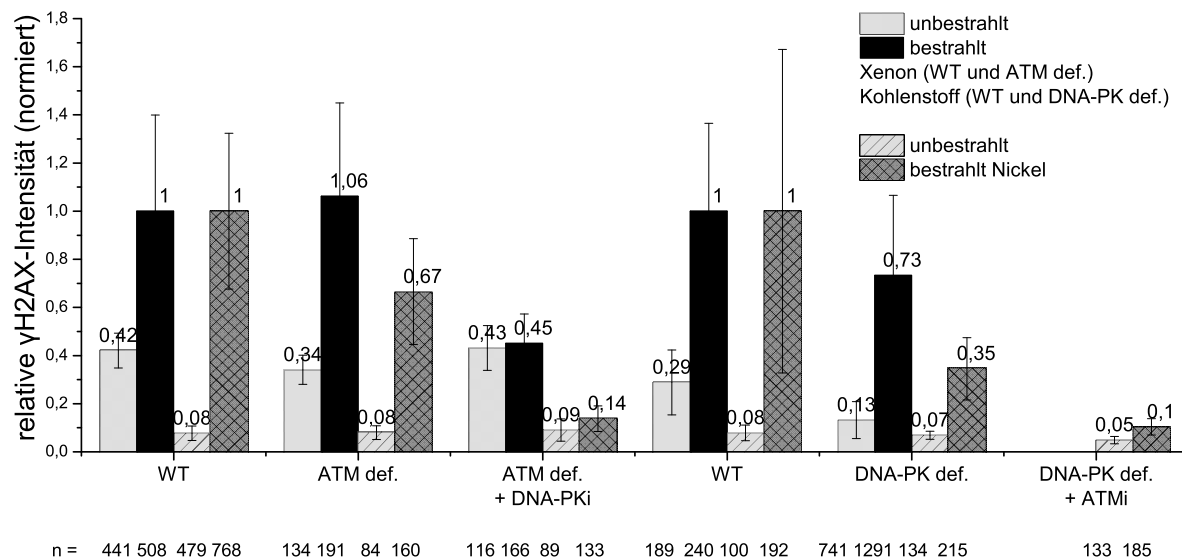
tersucht werden, ob dort das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal nach Ionenbestrahlung entsteht und ob dieses allein durch die Inhibition der jeweils anderen Kinase unterdrückt werden kann. Es wurden humane Fibroblasten und ATM-defiziente Fibroblasten, die entweder mit oder ohne DNA-PK-Inhibitor behandelt waren, mit 3 Xenonionen (9300 keV/ $\mu$ m, 18,3 Gy) bzw. 5 Nickelionen (3800 keV/ $\mu$ m, 12,5



**Abbildung 30: Einfluss von ATM- und DNA-PK-Inhibition auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung.** Es wurden humane Fibroblasten eine Stunde vor Bestrahlung bis eine Stunde nach Bestrahlung mit ATM-Inhibitor (ATMi), DNA-PK-Inhibitor (DNA-PKi), beiden Inhibitoren (ATMi + DNA-PKi) oder Koffein behandelt. Die Zellen wurden mit 40 Kohlenstoff- (290 keV/ $\mu$ m) oder 3 Xenonionen (9300 keV/ $\mu$ m) pro Zellkern bestrahlt und das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal eine Stunde nach Bestrahlung quantifiziert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichungen. n = Anzahl untersuchter Zellen.

Gy) pro Zellkern bestrahlt. Die Zellen wurden eine Stunde nach Bestrahlung fixiert und analysiert. Um die Ergebnisse beider Experimente besser vergleichen zu können, wurden die gemessenen Intensitäten jeweils auf die Intensität in WT-Zellen nach Bestrahlung normiert. Dadurch ergab sich der Nebeneffekt, dass unbestrahlte Zellen der gleichen Zelllinie stark unterschiedliche Intensitätswerte in beiden Experimenten aufweisen, was nicht einer tatsächlich stark unterschiedlichen Intensität in unbestrahlten Zellen entspricht, sondern durch die Normierung zustande kommt. Nach Xenonbestrahlung ist in ATM-defizienten Zellen das Signal genau so stark wie in WT Zellen, während es durch Inhibition von DNA-PK in ATM-defizienten Zellen auf Kontroll-Niveau herunterreguliert werden kann (Abb. 31). Nach Nickelbestrahlung hingegen betrug das  $\gamma$ H2AX-Signal in ATM-defizienten Zellen nur 67 % des Signals in WT-Zellen. Dieses konnte durch DNA-PK-Inhibition auf Kontroll-Niveau reduziert werden.

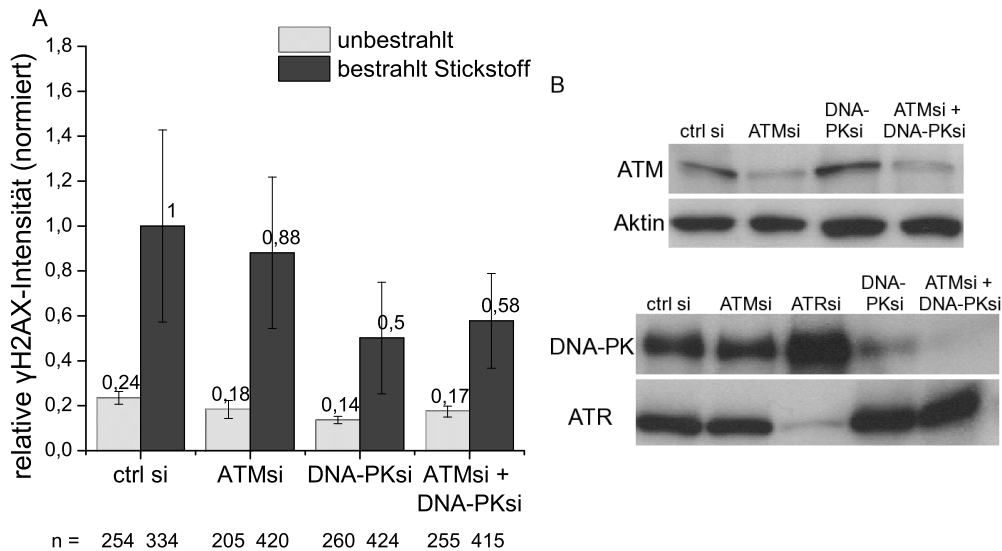
Desweiteren wurden DNA-PK-defiziente MEF-Zellen nach Bestrahlung mit 40 Kohlenstoff- (290 keV/ $\mu$ m, 7,7 Gy) oder 5 Nickelionen (3800 keV/ $\mu$ m, 12,5 Gy) pro Zellkern analysiert. Nach Kohlenstoffbestrahlung wurde in DNA-PK-defizienten Zellen nur 73 % des  $\gamma$ H2AX-Signals gegenüber WT-Zellen gemessen, nach Nickelbestrahlung 35 %. Nach Inhibition von ATM bei Nickelbestrahlung war die Signalentstehung vollständig unterdrückt. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Versuche, dass ATM und DNA-PK an der kernweiten Antwort beteiligt sind und bei Fehlen oder Inhibition der einen Kinase, die Phosphorylierung durch die andere Kinase durchgeführt wird, die Gesamtmenge  $\gamma$ H2AX jedoch bei Inhibierung einer Kinase meist reduziert ist.



**Abbildung 31: Untersuchung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung in ATM- und DNA-PK-defizienten Zelllinien.** Das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal nach Ionenbestrahlung wurde in verschiedenen Zelllinien quantifiziert. Es wurden humane Fibroblasten (WT), ATM-defiziente Fibroblasten (ATM-def.) und ATM-defiziente Fibroblasten, die mit DNA-PK-Inhibitor behandelt waren (ATM-def. + DNA-PKi), untersucht, sowie MEF Zellen (WT), DNA-PK-defiziente MEF Zellen (DNA-PK-def.) und DNA-PK-defiziente MEF Zellen, die mit ATM-Inhibitor behandelt waren (DNA-PK-def. + ATMi). Die Zellen wurden entweder mit 40 Kohlenstoff- (290 keV/ $\mu$ m), 5 Nickelionen (3800 keV/ $\mu$ m) oder 3 Xenonionen (9300 keV/ $\mu$ m) pro Zellkern bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung für die Immunfluoreszenzfärbung von  $\gamma$ H2AX fixiert. Es erfolgte die Quantifizierung des kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signals. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = Anzahl untersuchter Zellen.

#### 4.4.2 Das pan-nukleäre $\gamma$ H2AX-Signal nach Herunterregulierung von ATM und DNA-PK

Da mittels RNA-Interferenz eine spezifische Unterdrückung der Expression von ATM und DNA-PK, sowie ATR erzielt werden kann, sollte diese Methode verwendet werden, um die Abhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung von den genannten Kinasen zu untersuchen. Diese Untersuchungen wurden in U2OS Zellen (Osteosarkomzellen) nach Bestrahlung mit 40 Stickstoffionen (400 keV/ $\mu$ m) pro Zellkern durchgeführt. Nach Herunterregulierung von ATM war keine deutliche Unterdrückung des  $\gamma$ H2AX-Signals messbar. In diesem Fall wurde nur eine Reduktion des Signals um 12 % gemessen (Abb. 32 A), was innerhalb des Bereichs des Fehlers zwischen einzelnen Proben liegt. Es war also durch Herunterregulierung von ATM kein eindeutiger Effekt messbar, die Überprüfung der Herunterregulierung im Western Blot zeigte jedoch, dass nach Behandlung der Zellen mit ATM-siRNA die Menge ATM deutlich reduziert war (Abb. 32 B). Die restliche Menge an vorhandenem ATM könnte zusammen mit DNA-PK ausreichen, um H2AX nahezu vollständig zu phosphorylieren. Hingegen die Herunterregulierung von DNA-PKs bzw. ATM und DNA-PKs zusammen ergaben eine deutlichere Abschwächung des Signals im Vergleich zur Kontrolle auf 50 % bzw. 58 % (Abb. 32 A). Eine Ursache hierfür könnte sein, dass mit Herunterregulierung von DNA-PKs die Expression von vergleichsweise mehr Protein unterdrückt wird (Abb. 32 B). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Aktivität der Kinasen besser durch die jeweiligen spezifischen Inhibitoren unterdrückt werden kann, als durch Beeinflussung der Proteinexpression. Die Messungen bestätigen einen Einfluss von DNA-PK auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung, während für die Rolle von ATM in diesem Fall keine Aussage getroffen werden kann. Die Untersuchung des Einflusses von ATR auf die H2AX-Phosphorylierung ist in Kapitel 4.4.5 und 4.4.6 beschrieben.



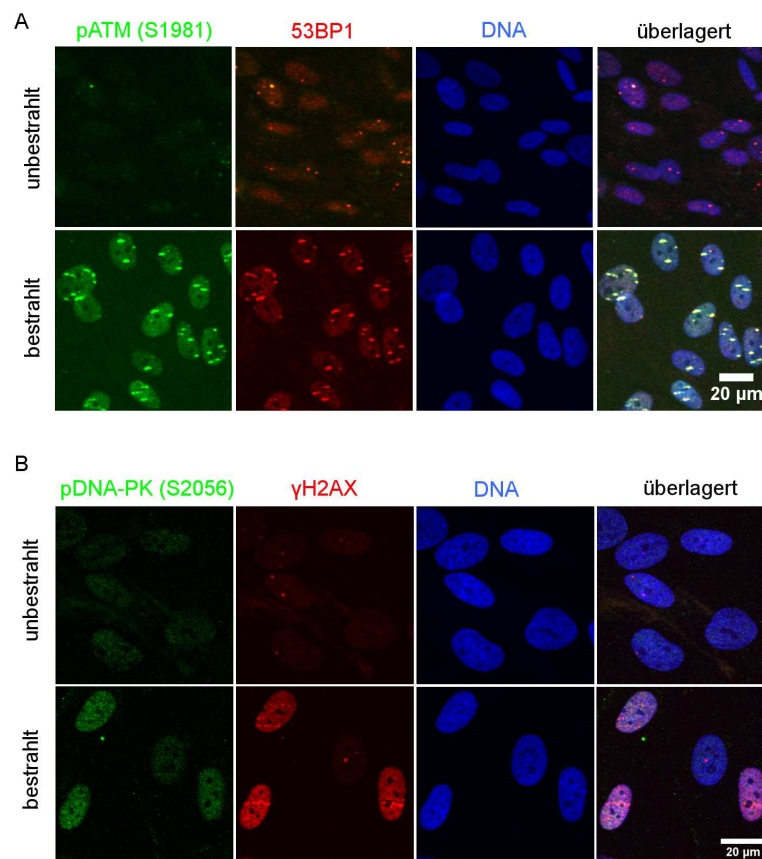
**Abbildung 32: Untersuchung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung nach Unterdrückung der Expression von ATM und DNA-PK.** Durch Behandlung mit siRNA wurden ATM (ATMsi) und DNA-PKs (DNA-PKsi) oder beide Proteine (ATMsi + DNA-PKsi) in U2OS Zellen herunterreguliert und (A) das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal eine Stunde nach Bestrahlung mit 40 Stickstoffionen (400 keV/ $\mu$ m) pro Zellkern quantifiziert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = Anzahl untersuchter Zellen. (B) Die Herunterregulierung der Kinasen wurde mittels Western Blot Analyse überprüft. Als Ladekontrolle dienten Aktin bzw. ATR.

#### 4.4.3 Lokalisation von aktiviertem ATM und DNA-PK nach Ionenbestrahlung

Da ATM und DNA-PK H2AX im nicht beschädigten Bereich der DNA phosphorylieren, sollte mikroskopisch überprüft werden, ob wie erwartet die aktivierten Formen von ATM und DNA-PK auch kernweit vorhanden sind. Dies geschah mittels Immunfluoreszenzfärbung der aktiven, autophosphorylierten Formen der Kinasen. Für aktiviertes ATM (pS1981) wurde eine Stunde nach schräger Bestrahlung mit Xenonionen (8660 keV/ $\mu$ m) ein intensives Signal an der Ionenspur, aber auch ein Signal überall im restlichen Zellkern detektiert (Abb. 33 A). Als Kontrolle für die Bestrahlung der Zellen wurde gleichzeitig die Akkumulation von 53BP1 am DNA-Schaden detektiert. Das Signal für DNA-PKcs (pS2056) war eine Stunde nach Bestrahlung mit Uranionen (15000 keV/ $\mu$ m) in bestrahlten Zellen intensiver und über den gesamten Zellkern gleichmäßig verteilt (Abb. 33 B). Eine Akkumulation von pDNA-PKcs (S2056) an der Ionenspur konnte jedoch nicht detektiert werden.

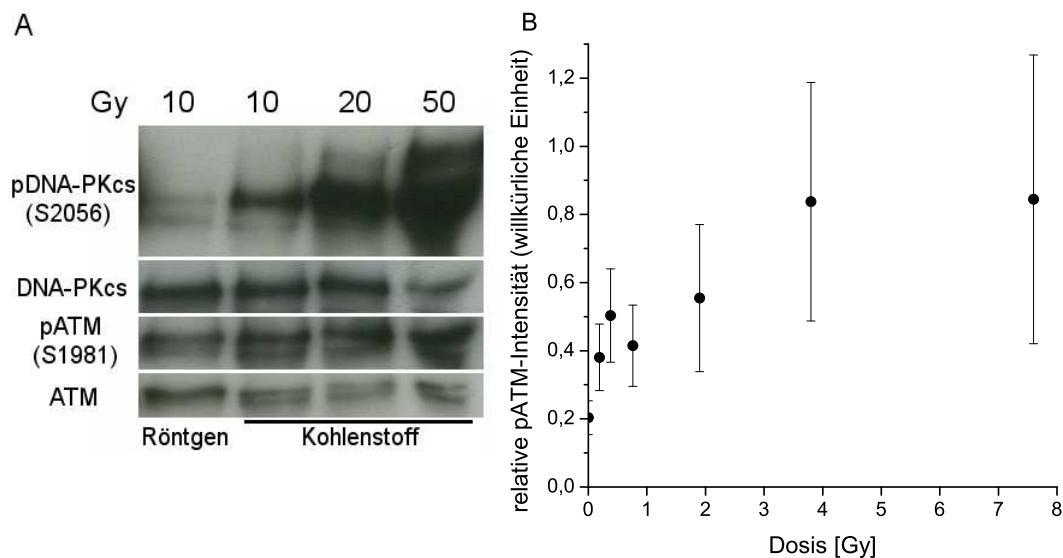
#### 4.4.4 Aktivierung von ATM und DNA-PK in Abhängigkeit von der Schadensqualität und Schadensquantität

Wie in Kapitel 4.2.1 gezeigt wurde, steigt das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal nach Bestrahlung mit zunehmender Dosis an. Es wäre denkbar, dass bei Bestrahlung mit sehr hohen Dosen nahezu die vollständige Menge ATM und DNA-PK aktiviert ist und dass die langsamere Zunahme des  $\gamma$ H2AX-Signals nach Bestrahlung mit höheren Dosen durch eine Sättigung der Aktivierung von ATM und DNA-PK zustande kommen könnte. Deswegen sollte untersucht werden, ob die Menge an aktiviertem ATM und DNA-PK bei sehr hohen Dosen noch weiter zunehmen kann oder ob es hier zu einer Sättigung kommt. Darüber hinaus entstand durch die Messung des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals der Eindruck, dass DNA-PK gerade bei höheren Dosen einen stärkeren Einfluss als ATM hat (vergleiche Abschnitt 4.4.1 und 4.4.2). Deswegen sollte überprüft werden, ob die Menge an pDNA-PKcs (S2056)



**Abbildung 33: Lokalisation von pATM (S1981) und pDNA-PKcs (S2056) im Zellkern nach Ionenbestrahlung.** (A) Humane Fibroblasten wurden mit Xenonionen (8660 keV/μm) bestrahlt und pATM (S1981) (grün) eine Stunde nach Bestrahlung detektiert. Als Schadensmarker diente 53BP1 (rot). (B) Die Zellen wurden mit Uranionen (15000 keV/μm) bestrahlt und das Signal von pDNA-PKcs (S2056) (grün) mit γH2AX (rot) als Schadensmarker eine Stunde nach Bestrahlung analysiert. Die DNA (blau) wurde mit ToPro-3 gefärbt. In beiden Fällen wurde schräg mit einer Fluenz von  $3 \cdot 10^6$  T/cm<sup>2</sup> bestrahlt.

nach Bestrahlung mit steigenden Dosen stärker ansteigen kann als die Menge pATM (S1981). Dazu wurden humane Fibroblasten mit 10, 20 oder 50 Gy Kohlenstoffionen (170 keV/μm) bestrahlt. Es wurde außerdem eine Probe mitgeführt, bei der die Zellen mit 10 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt waren. Die Menge pATM (S1981) und pDNA-PKcs (S2056) wurde im Western Blot untersucht und zur Kontrolle der geladenen Proteinmengen und um eine mögliche bestrahlungsinduzierte Erhöhung der Expression von ATM und DNA-PK auszuschließen, wurde unphosphoryliertes ATM und DNA-PKcs detektiert. Es zeigte sich, dass sich die Menge an pATM (S1981) zwischen den unterschiedlichen Dosen und Strahlenarten nicht deutlich unterscheidet (Abb. 34 A). Hingegen die Menge an pDNA-PKcs (S2056) nimmt bis zur Bestrahlung mit 50 Gy mit Kohlenstoffionen immer noch zu. Interessanterweise scheint hier die unterschiedliche Strahlungsart einen Effekt auf die Aktivierung von DNA-PK zu haben, da nach 10 Gy Röntgenbestrahlung deutlich weniger DNA-PK phosphoryliert ist als nach Bestrahlung mit 10 Gy Kohlenstoffionen. Bei der ATM-Aktivierung war zunächst jedoch kein vergleichbarer LET- oder Dosis-Effekt erkennbar. Es stellte sich also die Frage, ob es sich bei der Aktivierung von ATM um einen Prozess handelt, bei dem immer die vollständige ATM-Menge phosphoryliert wird oder ob ATM zwar dosisabhängig aktiviert wird, aber schon bei niedrigen Dosen eine Sättigung erreicht ist. Um dies zu untersuchen, wurde die Intensität des pATM-Signals im nicht



**Abbildung 34: Quantifizierung von pDNA-PKcs (S2056) und pATM (S1981) nach Bestrahlung mit unterschiedlichen Dosen und unterschiedlicher Bestrahlungsqualität.** (A) Es wurden humane Fibroblasten mit 10 Gy Röntgenstrahlen oder mit 10, 20 oder 50 Gy Kohlenstoffionen (170 keV/ $\mu$ m) bestrahlt. Eine Stunde nach Bestrahlung wurden Proteinlysate hergestellt und die Menge pDNA-PKcs (S2056) und pATM (S1981) mittels Western Blot Analyse untersucht. Als Kontrolle der aufgetragenen Proteinmenge und zur Kontrolle einer möglichen strahleninduzierten Erhöhung der Expression wurde unphosphoryliertes DNA-PKcs und ATM detektiert. (B) Humane Fibroblasten wurden mit verschiedenen Anzahlen Kohlenstoffionen (290 keV/ $\mu$ m) pro Zellkern im Punkt bestrahlt und das kernweite Signal von pATM (S1981) quantifiziert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

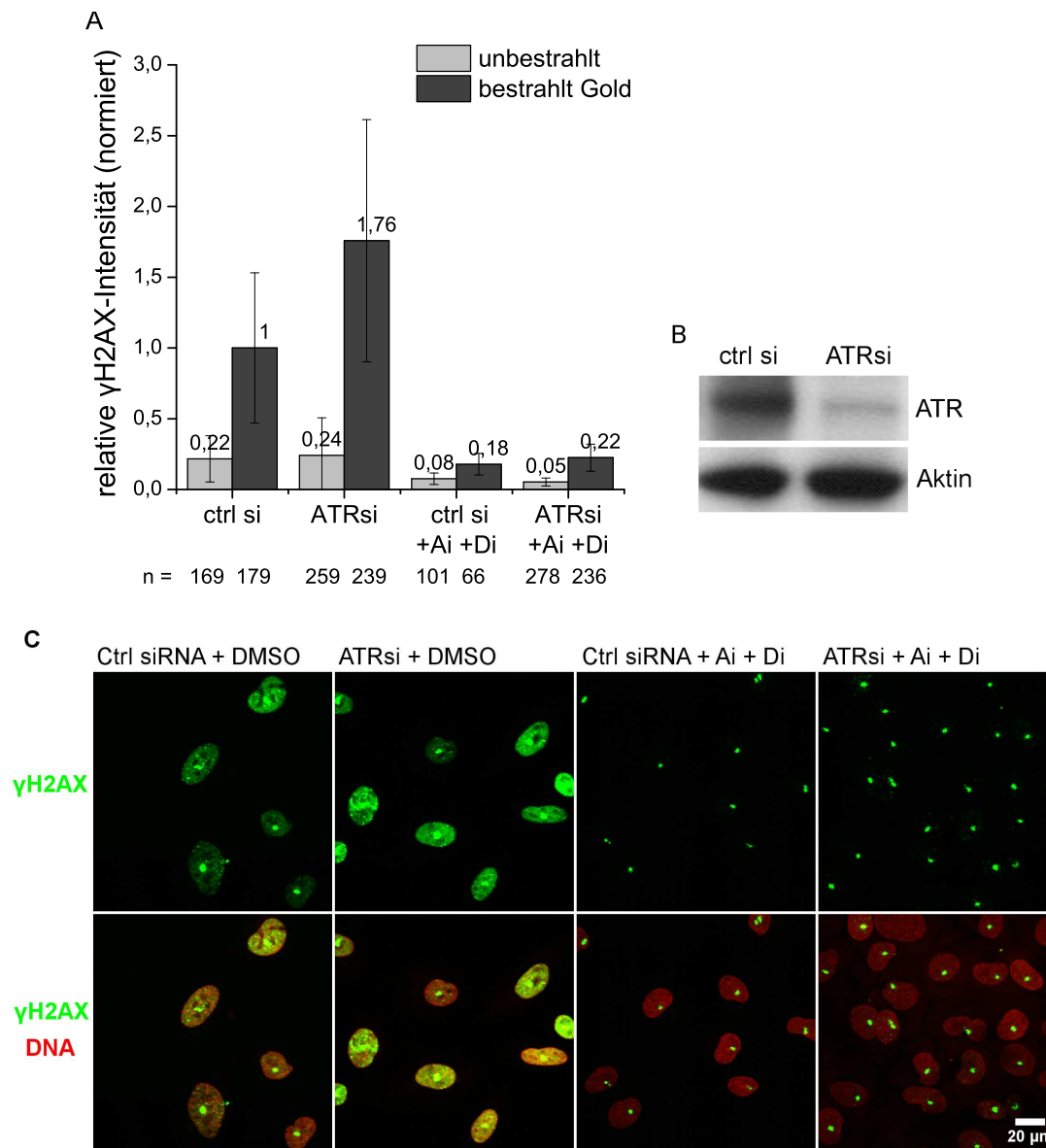
getroffenen Bereich des Zellkerns gemessen analog zur Messung des  $\gamma$ H2AX-Signals. Dazu wurden humane Fibroblasten an der Mikrosonde mit verschiedenen Anzahlen an Kohlenstoffionen (290 keV/ $\mu$ m) bestrahlt und das pATM-Signal detektiert. Eine Stunde nach Bestrahlung mit einem Kohlenstoffion, was einer Dosis von 0,19 Gy entspricht, ist bereits ein kernweites pATM-Signal messbar (Abb. 34 B). Dieses Signal steigt im Dosisbereich bis 20 Kohlenstoffionen noch weiter an. Zwischen der Bestrahlung mit 20 Kohlenstoffionen (3,8 Gy) und 40 Kohlenstoffionen (7,7 Gy) war in diesem Versuch kein Unterschied messbar. Bei der Untersuchung von pATM im Western Blot nach Bestrahlung mit 10 Gy Kohlenstoffionen wurde ebenfalls eine Sättigung der ATM-Aktivierung vermutet. Dieses Ergebnis deutet also darauf hin, dass es zumindest in einem Dosisbereich unter 3,8 Gy, also nach Bestrahlung mit weniger als 20 Kohlenstoffionen, nicht zur vollständigen Phosphorylierung von ATM kommt. Diese Ergebnisse könnten bedeuten, dass mit zunehmenden Dosen DNA-PK immer stärker für die pan-nukleäre Phosphorylierung von H2AX verantwortlich ist, während die durch ATM phosphorylierte Menge H2AX ab einer bestimmten Dosis gleich bleiben könnte.

#### 4.4.5 Einfluss von ATR auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung

Da das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal vollständig durch Inhibition von ATM und DNA-PK unterdrückt werden kann, war zu erwarten, dass ATR entweder keinen weiteren Einfluss auf die kernweite Phosphorylierung von H2AX ausübt oder dass die Aktivierung von ATR, die ATM-abhängig nach Resektion passiert (Jazayeri et al., 2006), bei ATM-Inhibition ebenfalls unterdrückt ist. Dadurch könnte ein möglicher geringer Einfluss von ATR übersehen werden. Deswegen sollte die Auswirkung einer Herunterregulierung von ATR auf das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal untersucht und mit dem Einfluss von ATM und DNA-PK auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung verglichen werden.



Dazu wurden U2OS Zellen mit Kontroll-RNA oder ATR-siRNA behandelt. Zusätzlich wurden die Zellen jeweils mit DMSO behandelt oder die ATM- und DNA-PK-Aktivität durch spezifische Inhibitoren unterdrückt. Eine Stunde nach Bestrahlung der Zellen mit 3 Goldionen (12800 keV/ $\mu\text{m}$ ) pro Zellkern war das pan-nukleäre  $\gamma\text{H2AX}$ -Signal in Zellen mit herunterreguliertem ATR stärker als in den mit Kontroll-RNA behandelten Zellen (Abb. 35 A). Dieses Ergebnis lässt zunächst nicht darauf schlie-



**Abbildung 35: Einfluss von ATR auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung.** U2OS Zellen wurden mit Kontroll-siRNA (ctrl si) oder mit ATR siRNA (ATRsi) behandelt und jeweils mit DMSO oder ATM-Inhibitor (Ai) und DNA-PK-Inhibitor (Di) behandelt. Die Zellen wurden mit 3 Goldionen (12800 keV/ $\mu\text{m}$ ) pro Zellkern bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung fixiert. (C)  $\gamma\text{H2AX}$  (grün) wurde detektiert und die DNA wurde mit ToPro-3 (rot) gefärbt, (A) das kernweite  $\gamma\text{H2AX}$ -Signal wurde quantifiziert. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = Anzahl untersuchter Zellen. (B) Die Menge an ATR wurde im Western Blot überprüft.

ßen, dass ATR bei der kernweiten Phosphorylierung von H2AX beteiligt ist, sondern eher, dass es dieser entgegenwirkt. Dieses Ergebnis müsste jedoch durch weitere Versuche bestätigt werden. Eine zusätzliche Inhibition von ATM und DNA-PK führte zur vollständigen Unterdrückung des Signals auf Kontroll-Niveau unabhängig von der Herunterregulierung von ATR. Die Menge an ATR nach Herunterregulierung wurde mittels Western Blot Analyse überprüft (Abb. 35 B). Abb. 35 C zeigt, dass die

Entstehung der  $\gamma$ H2AX-Foci jedoch auch bei gleichzeitiger Inaktivierung von ATM, ATR und DNA-PK nicht unterdrückt war.

#### **4.4.6 Rolle von ATM, DNA-PK und ATR bei der Entstehung der $\gamma$ H2AX-Foci**

In den Analysen der Kinaseabhängigkeit des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals zeigte sich, dass zwar das kernweite Signal durch Inhibition von ATM und DNA-PK unterdrückt wird, der Schadensfokus aber immer noch deutlich sichtbar ist, auch wenn zusätzlich die Expression von ATR herunterreguliert wurde. Eine mögliche Ursache für dieses Ergebnis wäre neben dem Einfluss einer möglichen vierten Kinase, dass die Kinasen der PIKK-Familie nach der Induktion von komplexen DNA-Schäden nach Schwerionenbestrahlung so stark aktiviert sind, dass ihre Aktivität nicht vollständig durch die Verwendung von Inhibitoren unterdrückt werden konnte und eine Herunterregulierung der Protein-Expression meist nicht vollständig ist. Die Restaktivität der Kinasen könnte daher ausreichen, um H2AX am Schaden zu phosphorylieren. Es sollte deshalb untersucht werden, ob nach Bestrahlung mit einem geringeren LET ein Einfluss von ATM- und DNA-PK-Inhibition bzw. Herunterregulierung von ATR auf die Phosphorylierung von H2AX am DNA-Schaden beobachtet werden kann.

Es wurden U2OS Zellen nach Bestrahlung mit Stickstoffionen (400 keV/ $\mu$ m) untersucht, wobei die ATR-Expression herunterreguliert wurde und ATM und DNA-PK inhibiert wurden. Es wurden drei einzelne Stickstoffionen mit einem Abstand von 3  $\mu$ m nebeneinander in den Zellkern gezielt oder 10 Stickstoffionen in einen Punkt und 4 einzelne Stickstoffionen um diesen Punkt herum. Diese Bestrahlungsmuster wurden gewählt, da einerseits die Ionen-induzierten Foci klar von den Kontroll-Foci zu unterscheiden sein sollten und andererseits überprüft werden sollte, ob ein Einfluss auf die H2AX-Phosphorylierung genauso gut nach einzelnen Treffern wie nach Bestrahlung mit 10 Ionen im Punkt zu detektieren ist. Abb. 36 zeigt, dass das Herunterregulieren von ATR allein keinen sichtbaren Einfluss auf die Bildung der  $\gamma$ H2AX-Foci hatte. Der erfolgreiche Unterdrückung der ATR-Expression konnte durch Analyse im Western Blot gezeigt werden (Abb. 32 C). Für das erste Bestrahlungsmuster mit 3 einzelnen Ionen nebeneinander führte die Inhibition von ATM und DNA-PK zu einer starken Unterdrückung der Foci-Bildung eine Stunde nach Bestrahlung. Eine zusätzliche Herunterregulierung von ATR verstärkte diese Wirkung nicht weiter (Abb. 36 A). Beim zweiten Bestrahlungsmuster konnte wiederum die Foci-Bildung bei Bestrahlung mit einzelnen Ionen unterdrückt werden, nicht jedoch nach Bestrahlung mit 10 Ionen im Punkt (Abb. 36 B). Wieder war die H2AX-Phosphorylierung am DNA-Schaden ATM- und DNA-PK-abhängig und nicht merklich beeinflusst durch ATR. Aus diesen Ergebnissen lässt sich folgern, dass ATM und DNA-PK maßgeblich für die H2AX-Phosphorylierung am DNA-Schaden verantwortlich sind und dass nach Ionenbestrahlung, besonders bei hohem LET oder mehreren Treffern in einen Punkt, die Restaktivität der beiden Kinasen nach Inhibition noch ausreichend ist, um die Schadensfoci entstehen zu lassen.

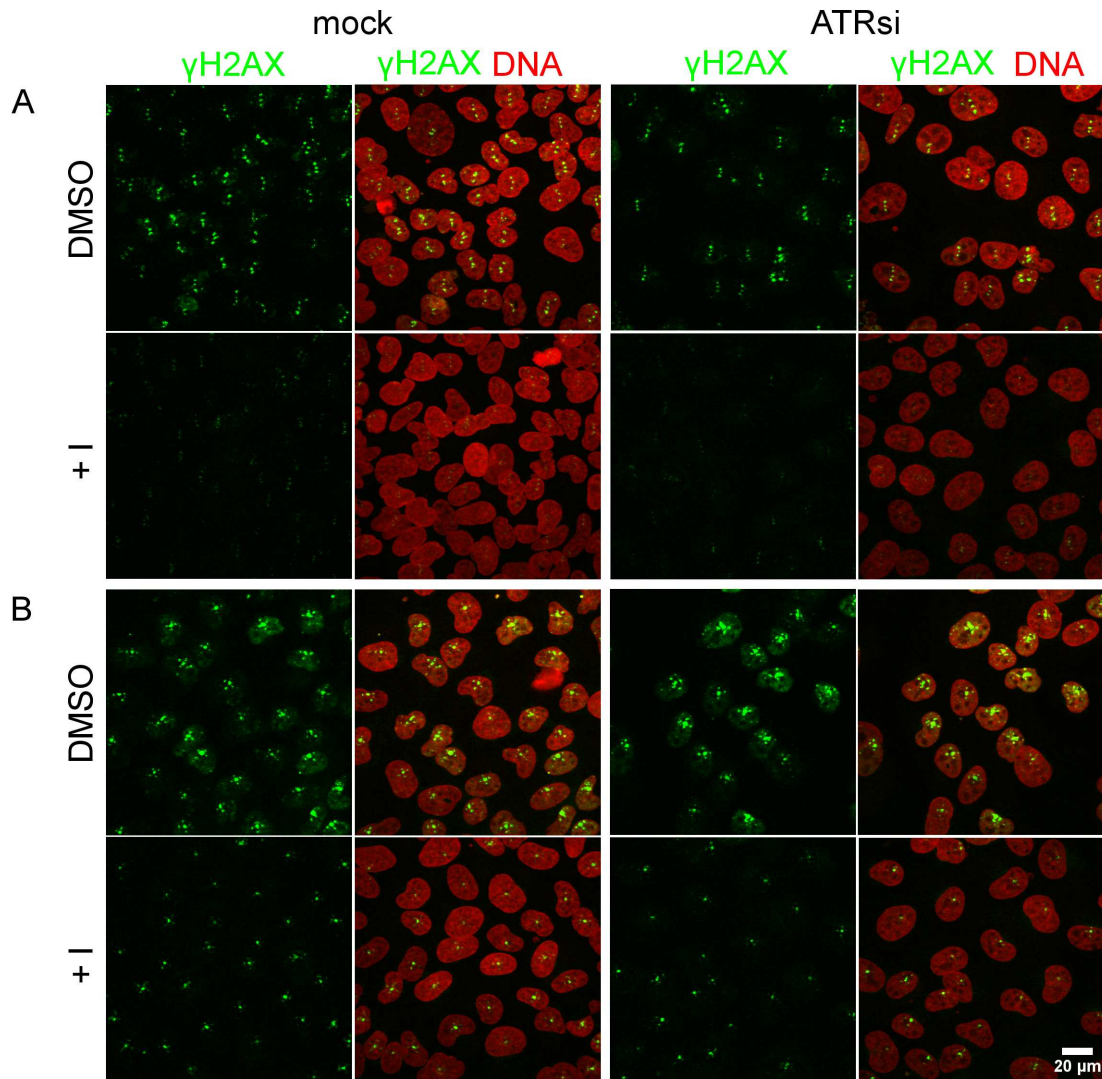


Abbildung 36: Einfluss von ATM, DNA-PK und ATR auf die Bildung der  $\gamma$ H2AX-Foci nach Ionenbestrahlung. U2OS Zellen wurden entweder mit (A) 3 einzelnen Stickstoffionen (400 keV/ $\mu$ m) nebeneinander oder (B) 10 Stickstoffionen im Punkt und 4 einzelnen Stickstoffionen um den zentralen Punkt herum bestrahlt. Es wurde ATR durch siRNA herunterreguliert (ATRsi) oder die Zellen mit Transfektionsreagenz behandelt (mock). Zusätzlich wurden die Zellen mit ATM- und DNA-PK-Inhibitor (+ I) oder DMSO behandelt. Die Zellen wurden eine Stunde nach Bestrahlung fixiert und  $\gamma$ H2AX (grün) und die DNA mit ToPro-3 (rot) gefärbt.

#### 4.5 Untersuchung des Einflusses von Chromatinstrukturveränderung auf die kernweite Phosphorylierung von H2AX

Nachdem erwiesen wurde, dass ATM und DNA-PK die kernweite H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung übernehmen, sollte auf die Frage näher eingegangen werden, wodurch die H2AX-Phosphorylierung im Chromatinbereich ohne DNA-Schäden ausgelöst wird. Untersuchungen von Bakkenist und Kastan (2003) deuten darauf hin, dass ATM durch Chromatinstrukturveränderung nach Behandlung von Zellen mit hypotonischer Lösung in Abwesenheit von DNA-Schäden aktiviert werden kann. Nach hypotoner Behandlung fanden Baure et al. (2009), dass H2AX pan-nukleär phosphoryliert wird, ebenfalls ohne die Induktion von DNA-Schäden. Die Anwesenheit von DNA-Schäden scheint also keine Grundvoraussetzung für die Phosphorylierung von H2AX zu sein. Die-

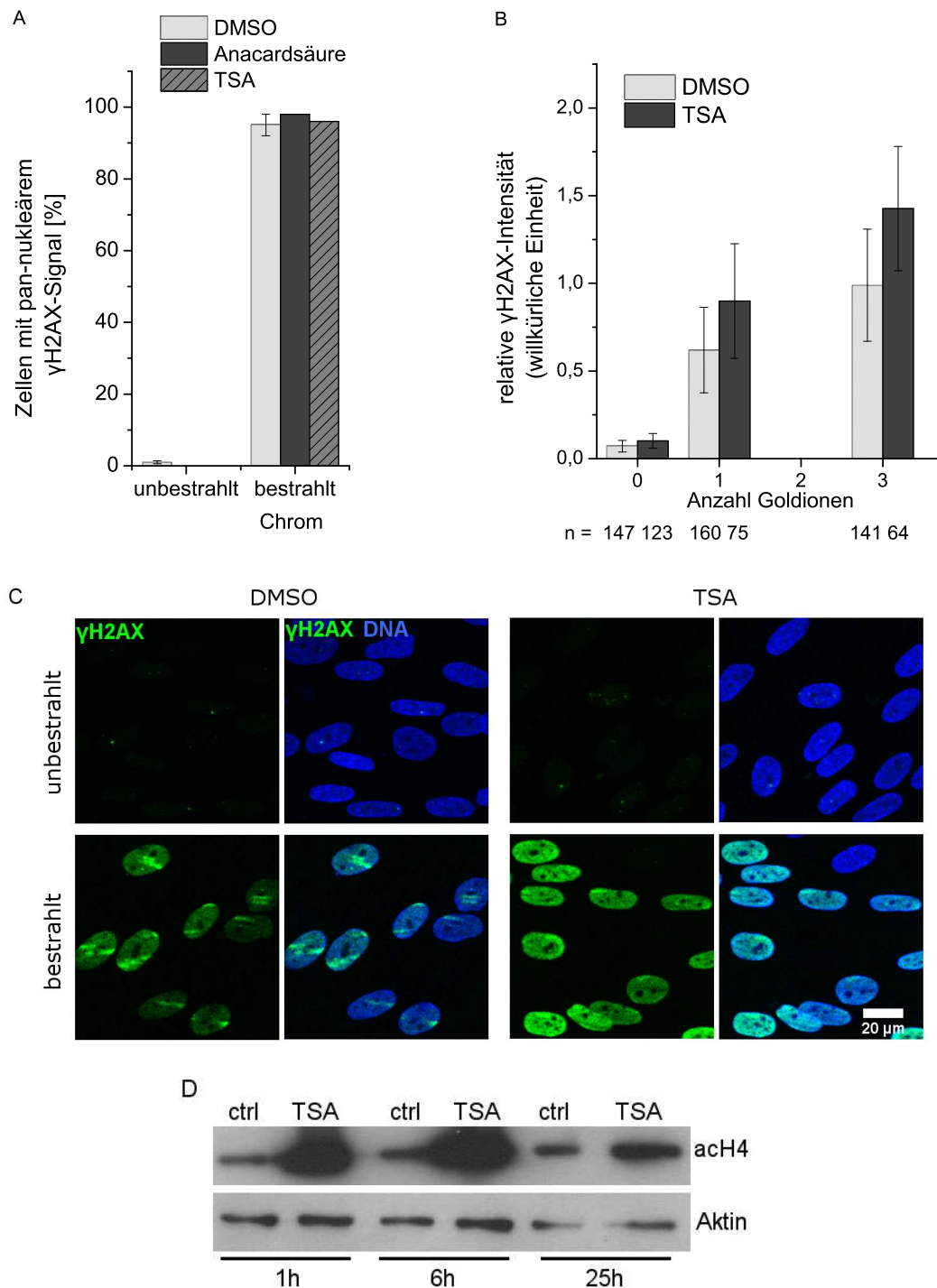
se Untersuchungen weisen darauf hin, dass Chromatinstrukturveränderungen die Phosphorylierung von H2AX auslösen könnten. Es wäre denkbar, dass durch Ionenbestrahlung induziertes pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX als Folge einer kernweiten Chromatinstrukturveränderung entsteht. Deshalb sollte untersucht werden, ob eine acetylierungsabhängige Chromatinauflockerung bzw. deren Inhibition einen Einfluss auf die pan-nukleäre H2AX-Phosphorylierung ausübt.

Wenn die Bildung von  $\gamma$ H2AX *downstream* von einer globalen Chromatinstrukturveränderung erfolgt, wäre es denkbar, dass bei Inhibition dieser Strukturveränderung durch Inhibition von Histonacetyltransferasen (HAT)  $\gamma$ H2AX nicht entstehen kann. Wenn jedoch nach Ionenbestrahlung die kernweite H2AX-Phosphorylierung *upstream* passiert und einer globalen Chromatinstrukturveränderung vorausgehen muss, könnte es sein, dass bei einem durch Hyperacetylierung bereits dekondensierten Chromatin, also durch Behandlung mit Inhibitoren von Histondeacetylasen (HDACs) die Bildung von  $\gamma$ H2AX nicht mehr benötigt wird.

Um diese Fragestellungen zu untersuchen, sollte eine Hyperacetylierung des Chromatins durch Verwendung des HDAC-Inhibitors TSA ausgelöst werden. Als Acetyltransferase Inhibitor wurde Anacardsäure eingesetzt. Konfluente humane Fibroblasten wurden 21 Stunden vor Bestrahlung mit TSA behandelt, um Hyperacetylierung auszulösen oder 30 Minuten vor Bestrahlung mit dem Acetyltransferase-Inhibitor Anacardsäure, um mögliche Acetylierungsprozesse nach der Bestrahlung zu inhibieren. Die Zellen wurden schräg mit Chromionen (2630 keV/ $\mu$ m) bestrahlt, eine Stunde nach Bestrahlung fixiert und  $\gamma$ H2AX durch Immunfluoreszenzfärbung detektiert. Es wurde gezählt, wieviele der bestrahlten Zellen nach Behandlung ein kernweites  $\gamma$ H2AX-Signal zeigen. Nach allen beschriebenen Behandlungen der Zellen mit Inhibitoren waren nach Bestrahlung über 95 % der Zellen positiv für das pan-nukleäre Signal, bei den unbestrahlten Zellen waren unabhängig von der Behandlung weniger als 1 % positiv (Abb. 37 A).

Es entstand jedoch der Eindruck, dass das  $\gamma$ H2AX-Signal nach TSA-Behandlung intensiver ist. Diese Beobachtung wurde nach Bestrahlung mit Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) bestätigt (Abb. 37 C). Die Fibroblasten waren hier eine Stunde vor Bestrahlung mit TSA behandelt, da sich herausstellte, dass bereits in diesem Behandlungszeitraum eine starke Hyperacetylierung der Histone vorliegt (Abb. 37 D), und eine Stunde nach Bestrahlung analysiert.

Um den Einfluss einer Hyperacetylierung genauer zu quantifizieren wurde eine Messung des pan-nukleären Signals nach TSA-Behandlung nach definierter Ionenbestrahlung an der Mikrosonde durchgeführt. Die konfluenten humanen Fibroblasten wurden eine Stunde vor Bestrahlung mit TSA behandelt, mit 1 oder 3 Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) im Punkt bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung fixiert. Die Quantifizierung des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals zeigt, dass in unbestrahlten Zellen durch TSA-Behandlung  $\gamma$ H2AX nicht induziert wird. Nach Bestrahlung ist jedoch für beide Dosen eine leichte Erhöhung des kernweiten Signals nach TSA-Behandlung messbar (Abb. 37 B). Zusammenfassend kann also gesagt werden, dass kein Hinweis auf eine *upstream*-Funktion von pan-nukleärem  $\gamma$ H2AX gefunden wurde, da die kernweite Antwort auch dann noch stattfand, wenn das Chromatin bereits dekondensiert war, wie es bei Hyperacetylierung von Histonen zu erwarten ist. In diesem Fall ist die Phosphorylierung sogar noch verstärkt. Es wurde auch kein Hinweis dafür gefunden, dass acetylierungsabhängige Chromatinstrukturveränderungen eine Voraussetzung für die kernweite Antwort sind, da bei Inhibition von HATs ebenfalls  $\gamma$ H2AX kernweit gebildet wurde. Außerdem führte eine durch Hyperacetylierung induzierte Auflockerung des Chromatins allein, also



**Abbildung 37: Einfluss von Acetylierung auf pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX.** Der Einfluss von TSA- oder Anacardsäurebehandlung auf die kernweite Phosphorylierung wurde in humanen konfluenten Fibroblasten untersucht. (A) Die TSA-Behandlung (HDAC-Inhibition) erfolgte 21 Stunden vor Bestrahlung, die Anacardsäurebehandlung (HAT-Inhibition) 30 Minuten vor Bestrahlung mit Chromionen ( $2630 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ,  $4 \cdot 10^6 \text{ T}/\text{cm}^2$ ). Die Zellen wurden eine Stunde nach Bestrahlung fixiert und  $\gamma$ H2AX detektiert. Die Anzahl der Zellen mit pan-nukleärem  $\gamma$ H2AX-Signal wurde ausgezählt. Für DMSO ist der Mittelwert und die Standardabweichung 3 unabhängiger Proben gezeigt. (B) Das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal wurde eine Stunde nach Bestrahlung mit 1 oder 3 Goldionen ( $12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) im Punkt quantifiziert. Die Zellen waren dabei 1 Stunde vor Bestrahlung mit TSA behandelt. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.  $n$  = Anzahl untersuchter Zellen. (C) Nach einstündiger TSA-Behandlung wurden die Zellen schräg mit Goldionen ( $12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ,  $3 \cdot 10^6 \text{ T}/\text{cm}^2$ ) bestrahlt und eine Stunde nach Bestrahlung  $\gamma$ H2AX (grün) und die DNA (blau) mit ToPro-3 angefärbt. (D) Die Hyperacetylierung der Histone nach verschiedenen Zeiten TSA-Behandlung im Vergleich zur DMSO-Behandlung (ctrl) wurde mittels Western Blot Analyse durch Detektion von acetyliertem H4 (acH4) überprüft. Aktin wurde als Ladekontrolle detektiert.

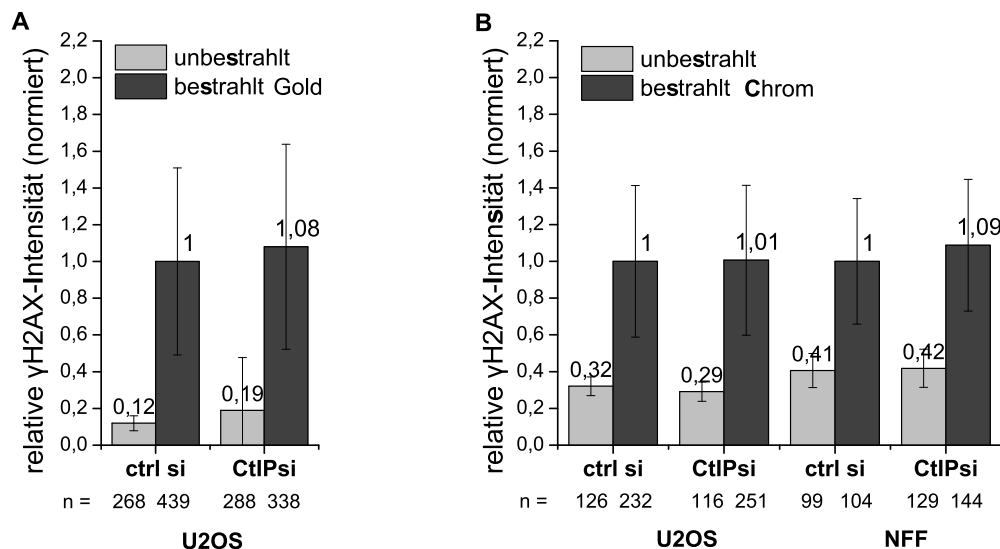
ohne Bestrahlung, nicht zu einer kernweiten Phosphorylierung von H2AX.

## **4.6 Untersuchung der Rolle von Resektion bei der Entstehung des kernweiten $\gamma$ H2AX-Signals**

### **4.6.1 Einfluss von CtIP auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung**

Es wäre aber auch möglich, dass ATM und DNA-PK nicht am unbeschädigten Chromatin aktiviert werden, sondern vorwiegend direkt am DNA-Schaden und dann in aktivierter Form von den Brüchen weg diffundieren und anschließend H2AX zu einem geringen Anteil unspezifisch phosphorylieren. Für die Aktivierung von DNA-PK sind DNA-Enden entscheidend, denn es wird angenommen, dass die Bindung von DNA-PKs an DNA eine Konformationsänderung von DNA-PKs bewirkt, die wichtig für dessen Aktivierung ist (Meek et al., 2008). Eine mögliche Erklärung für die kernweite Aktivität von DNA-PK wäre daher auch das Auftreten von DNA-Fragmenten nach Ionenbestrahlung. Es wurde gezeigt, dass DNA-PK in humanen Zellen durch Transfektion von DNA-Fragmenten einer Länge von nur 32 bp aktiviert werden kann (Quanz et al., 2009b). Auch ATM kann in humanen Zellextrakten durch Fragmente mit einer Länge von 20 bp und stärker durch 40 und 70 bp lange DNA-Fragmente aktiviert werden (Shiotani und Zou, 2009). Bei Ionenbestrahlung könnten solche DNA-Fragmente entstehen, durch den Zellkern diffundieren und ATM und DNA-PK im nicht getroffenen Bereich des Zellkerns aktivieren. Die Bildung dieser DNA-Stücke könnte durch die Aktivität von Nukleasen weiter verstärkt werden, da durch den Verdau von DNA Enden im Bereich von Einzelstrangbrüchen einzelsträngige DNA-Fragmente von der DNA gelöst werden könnten. Bei Rückfaltung der einzelsträngigen DNA-Fragmente könnten doppelsträngige DNA-Stücke mit Haarnadel-Strukturen entstehen, die vor allem DNA-PK zusätzlich aktivieren könnten. Dieser Effekt könnte besonders nach Ionenbestrahlung zum Tragen kommen, da bedingt durch den hohen LET und die resultierende hohe Schadensdichte eine höhere Anzahl an korrelierten SSBs entsteht als nach dünn ionisierender Bestrahlung.

Es wurde deshalb zunächst untersucht, ob CtIP einen Einfluss auf die kernweite Phosphorylierung von H2AX hat. Dazu wurde in U2OS und Telomerase-immortalisierten humanen Fibroblasten (NFFhTert) eine Herunterregulierung von CtIP durchgeführt und die Signalintensität von  $\gamma$ H2AX eine Stunde nach Bestrahlung mit Gold- (12800 keV/ $\mu$ m) oder Chromionen (3000 keV/ $\mu$ m) gemessen. Die Unterdrückung der CtIP-Expression wurde nicht nur in U2OS Zellen sondern auch in immortalisierten Fibroblasten durchgeführt, da U2OS Zellen eine hohe individuelle Schwankung in der Intensität des kernweiten Signals zwischen einzelnen Zellen zeigten, die für Fibroblasten nicht erwartet wurde (vergleiche Kapitel 4.1.1). Die NFFhTert Zellen wurden mit einer niedrigeren Dosis bestrahlt (6 Chromionen) als U2OS Zellen (10 Chromionen), da Fibroblasten schon bei einer geringeren Dosis ein gut messbares pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX-Signal ausbilden. Die Menge an CtIP wurde im Western Blot überprüft (Abb. 40). Nach Bestrahlung mit Goldionen ist in U2OS Zellen bei Herunterregulierung von CtIP kein Unterschied zur Intensität in den kontrollbehandelten Zellen auszumachen (Abb. 38 A) und nach Bestrahlung mit Chromionen ist ebenfalls kein klarer Einfluss von CtIP für beide Zelllinien feststellbar (Abb. 38 B).

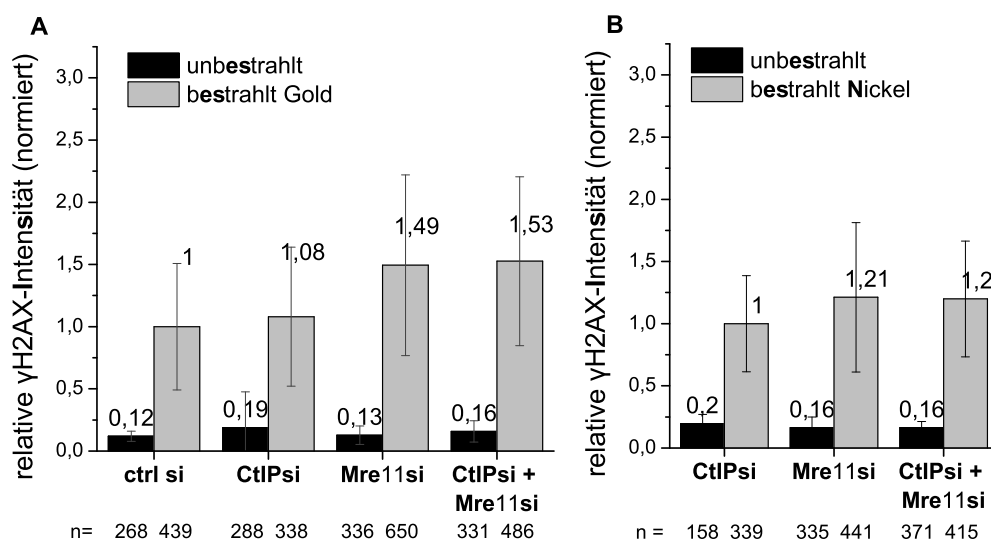


**Abbildung 38: Quantifizierung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung nach Herunterregulierung von CtIP.** Es wurde die Expression von CtIP in U2OS und NFFhTert Zellen (NFF) unterdrückt. Das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal wurde eine Stunde nach Bestrahlung mit (A) 3 Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) pro U2OS Zellkern und (B) 10 Chromionen (3000 keV/ $\mu$ m) pro U2OS Zellkern und 6 Chromionen pro NFF Zellkern gemessen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = Anzahl untersuchter Zellen.

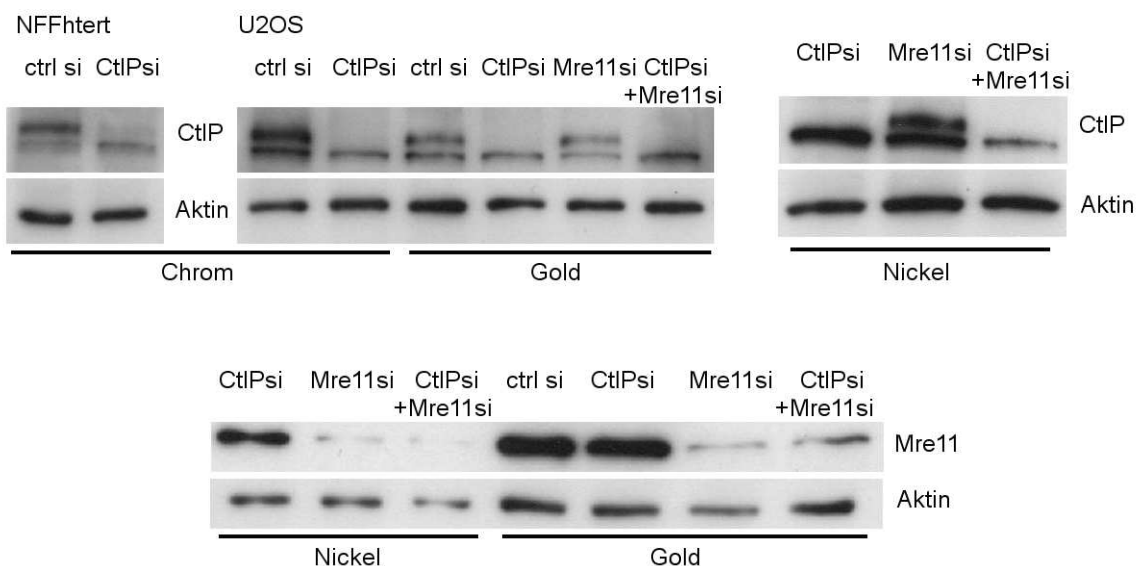
#### 4.6.2 Einfluss von Mre11 auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung

Neben CtIP sind noch weitere Nukleasen in humanen Zellen an der Resektion von DNA-Enden beteiligt. Mre11 ist im MRN-Komplex an der frühen DNA-Schadenserkennung beteiligt (Williams et al., 2010) und vermittelt zusammen mit CtIP die ersten Schritte der Prozessierung von DNA-Enden (You und Bailis, 2010). Daher könnte Mre11 für die Bildung von DNA-Fragmenten nach ionisierender Strahlung mit verantwortlich sein. Es sollte deshalb überprüft werden, ob Mre11 einen Einfluss auf die Entstehung von kernweisem  $\gamma$ H2AX hat. Dazu wurde eine Herunterregulierung von Mre11 in U2OS Zellen durchgeführt und das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal in den Zellen eine Stunde nach Bestrahlung quantifiziert. Da Mre11 und CtIP bei der Resektion eine überlappende Funktion haben könnten, wurde zusätzlich eine Herunterregulierung von beiden Nukleasen durchgeführt.

Nach Bestrahlung mit Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) erscheint das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal nach Herunterregulierung von Mre11 auf das 1,5-fache erhöht im Vergleich zu den Zellen der Kontrolle oder im Vergleich zu mit CtIP-siRNA behandelten Zellen (Abb. 39 A). Eine zusätzliche Unterdrückung von CtIP erbrachte keinen zusätzlichen Effekt zur Unterdrückung der Expression von Mre11. Nach Bestrahlung mit Nickelionen (3800 keV/ $\mu$ m) ist bei Herunterregulierung von Mre11 das kernweite Signal auf das 1,2-fache erhöht im Vergleich zu Zellen mit herunterreguliertem CtIP (Abb. 39 B). Auch hier war kein zusätzlicher Effekt durch die gleichzeitige Unterdrückung beider Nukleasen zu verzeichnen. Diese Ergebnisse bestätigen also, dass CtIP offenbar keinen Einfluss auf die Entstehung von pan-nukleärem  $\gamma$ H2AX hat. Mre11 hingegen könnte einen schwachen Einfluss auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung haben, allerdings scheint Mre11 die Phosphorylierung eher zu verringern.



**Abbildung 39: Intensität des kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signals nach Herunterregulierung von CtIP und Mre11.** Es wurde eine Unterdrückung der Expression von CtIP, Mre11 oder beiden Nukleasen in U2OS Zellen durchgeführt und die Intensität des  $\gamma$ H2AX-Signals eine Stunde nach Bestrahlung mit (A) 3 Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) pro Zellkern (25,5 Gy) oder (B) 10 Nickelionen (3800 keV/ $\mu$ m) pro Zellkern (25 Gy) gemessen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung. n = Anzahl untersuchter Zellen.



**Abbildung 40: Überprüfung der Mengen an CtIP und Mre11 mittels Western Blot Analyse nach Unterdrückung der Proteinexpression.** Es wurden bei den verschiedenen Strahlzeiten parallel Proben mitgeführt, die mit den gleichen Transfektionsreagenzien behandelt waren, wie die Zellen für die  $\gamma$ H2AX-Quantifizierung. Die Proteinmengen von Mre11, CtIP und Aktin wurden analysiert.



#### 4.7 Kernweite Signale anderer Zielproteine von ATM und DNA-PK

Eine mögliche Ursache für die Bildung des kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signals könnte eine Überaktivierung der Kinasen sein, das heißt, dass ATM und DNA-PK in so großer Menge und so stark aktiviert sein könnten, dass sie in aktivierter Form durch den Zellkern diffundieren und ihre Zielproteine unspezifisch phosphorylieren. In der Literatur wurde nach Induktion einer starken kernweiten H2AX-Phosphorylierung als Stressantwort auf verschiedene Behandlungen auch die Phosphorylierung anderer Reparaturfaktoren nachgewiesen. Neben einer Phosphorylierung von H2AX ist unter anderem eine starke Phosphorylierung von RPA (S4/S8) und NBS1 (S343) von Quanz et al. (2009b) nach Transfektion von Zellen mit 32 bp langen DNA-Fragmenten gezeigt oder auch von Collaco et al. (2009) nach Ko-Infektion von Zellen mit Adeno- und Adeno-assoziierten Viren. Um zu überprüfen, ob es auch nach Ionenbestrahlung zu einer ähnlichen Reaktion kommt, wurde die Lokalisation der phosphorylierten Formen von NBS1 (S343) und RPA (S4/S8) im Zellkern eine Stunde nach Bestrahlung mit Eisenionen (3050 keV/ $\mu$ m) bzw. Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) untersucht. Für pRPA

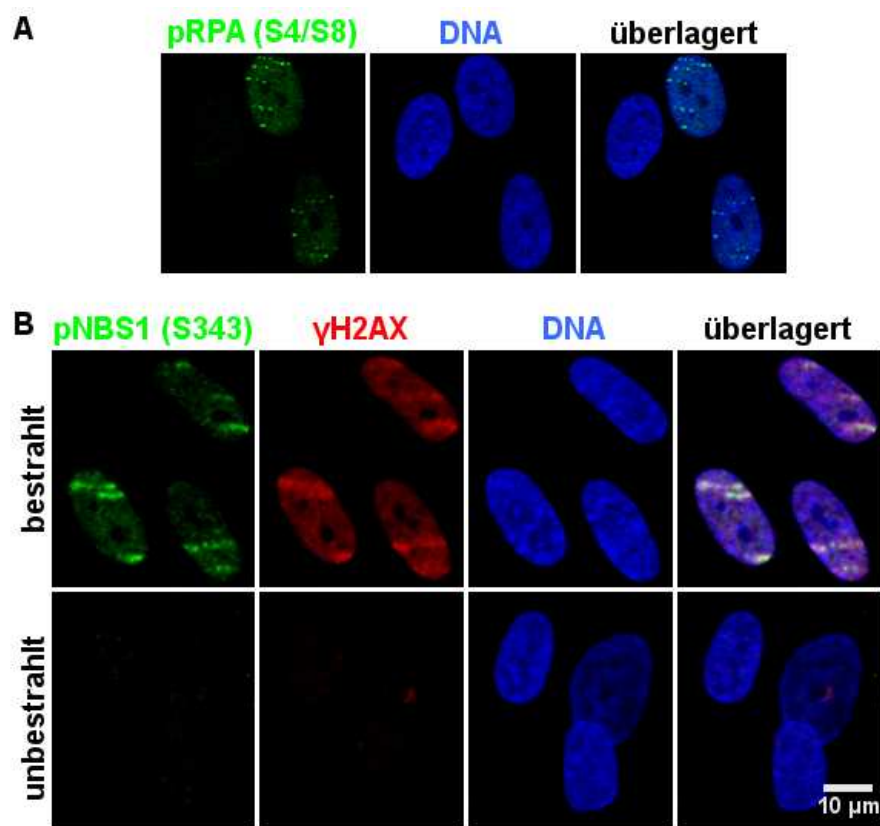


Abbildung 41: Lokalisation von pRPA (S4/S8) und pNBS1 (S343) im Zellkern nach Ionenbestrahlung. (A) Eine Stunde nach seitlicher Bestrahlung mit Eisenionen (3050 keV/ $\mu$ m,  $4 \cdot 10^6$  T/cm<sup>2</sup>) wurden humane Fibroblasten fixiert und pRPA (S4/S8) (grün) und die DNA mit ToPro-3 (blau) angefärbt. (B) Humane Fibroblasten wurden seitlich mit Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m,  $3 \cdot 10^6$  T/cm<sup>2</sup>) bestrahlt, eine Stunde später fixiert und pNBS1 (S343) (grün),  $\gamma$ H2AX (rot) und die DNA mit ToPro-3 (blau) gefärbt.

(S4/S8) (Abb. 41 A) und pNBS1 (S343) (Abb. 41 B) zeigte sich jedoch, dass sich im nicht getroffenen Bereich nur sehr geringe Mengen der phosphorylierten Proteine befinden. Das Signal im nicht getroffenen Bereich liegt nahe der Detektionsgrenze und könnte durch Diffusion der Proteine von den beschädigten DNA-Bereichen weg durch den Zellkern ausgelöst werden. Das bedeutet, dass die untersuchten Zielproteine von ATM und DNA-PK nicht im gleichen Maß im unbeschädigten Be-

reich der DNA phosphoryliert werden wie H2AX. Diese Ergebnisse könnten darauf hindeuten, dass es sich bei der H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung durch ATM und DNA-PK nicht um eine unspezifische Reaktion der Kinasen handelt oder dass die Phosphorylierung von H2AX nach der initialen Phosphorylierung verstärkt wird (vergleiche Kapitel 4.8.4).

## **4.8 Bedeutung von pan-nukleärem $\gamma$ H2AX für die Rekrutierung anderer Reparaturproteine**

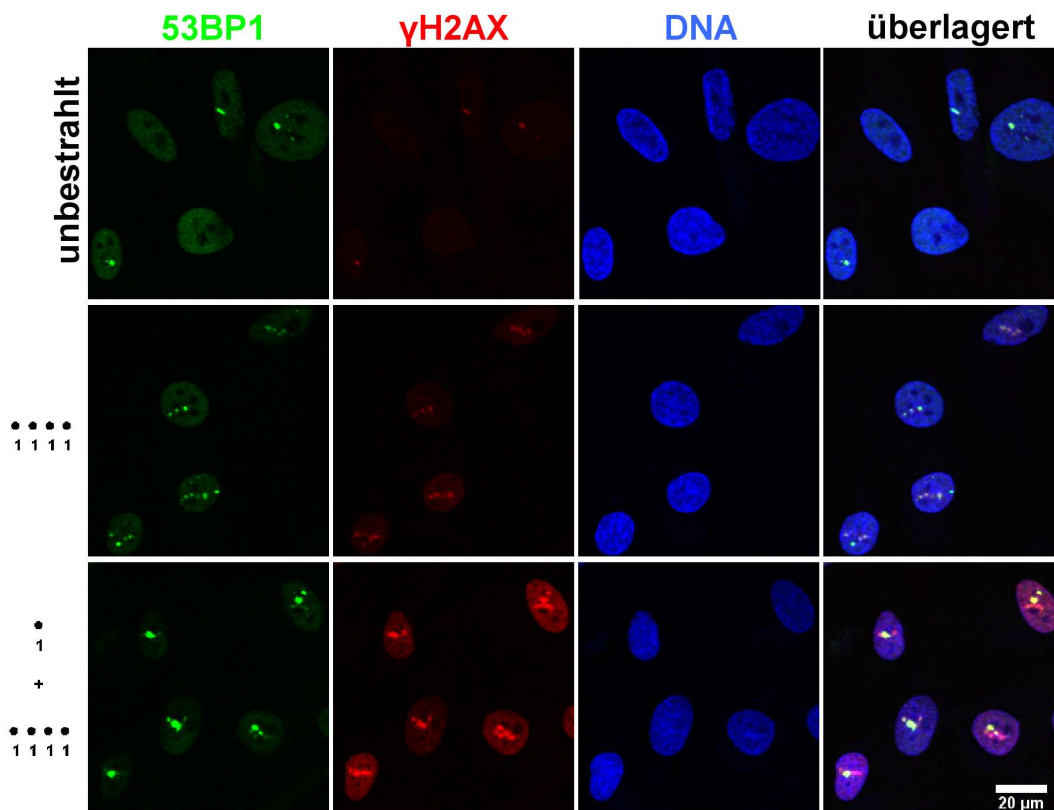
### **4.8.1 Bildung von 53BP1- und MDC1-Foci nach sequentieller Bestrahlung mit Ionen**

Da  $\gamma$ H2AX eine Bindungsplattform für andere Reparaturproteine darstellt, sollte untersucht werden, ob die kernweite Bildung von  $\gamma$ H2AX einen Einfluss auf andere Reparaturfaktoren hat. Andere Proteine könnten an kernweites  $\gamma$ H2AX binden und dadurch die Menge an ungebundenen Reparaturfaktoren im Zellkern verringert sein, so dass bei der Induktion von weiteren DNA-Schäden durch eine zweite Bestrahlung die Bildung von sekundären Reparaturfoci unterdrückt sein könnte. Um diese Fragestellung zu untersuchen, sollte die kernweite H2AX-Phosphorylierung induziert werden, die Fläche des primären Schadens jedoch möglichst gering gehalten werden, um zu erreichen, dass ein möglicher Effekt einer ersten Bestrahlung eher durch die Bindung der Reparaturfaktoren an kernweites  $\gamma$ H2AX entsteht als durch Bindung an den primären Schaden.

Daher wurden humane Fibroblasten an der Mikrosonde zuerst mit einem Goldion (12800 keV/ $\mu$ m) bestrahlt, um die kernweite H2AX-Phosphorylierung zu induzieren. Die Zellen wurden eine Stunde im Brutschrank inkubiert und dann ein zweites Mal bestrahlt mit vier einzelnen Goldionen in einer Reihe nebeneinander im Abstand von 3  $\mu$ m, so dass sich die Foci der zweiten Bestrahlung durch dieses Bestrahlungsmuster klar identifizieren ließen. Nach der zweiten Bestrahlung wurden die Zellen für weitere 15 Minuten inkubiert, so dass sich die Foci der zweiten Bestrahlung ausbilden konnten, und dann fixiert. Als Vergleich wurden Zellkerne in anderen Bestrahlungsfeldern der gleichen Probe 15 Minuten vor der Fixierung nur mit vier einzelnen Ionen nebeneinander bestrahlt, ohne dass eine Stunde zuvor die Bestrahlung mit einem einzelnen Goldion erfolgte. Da die Anwesenheit von H2AX nötig ist für die Entstehung von MDC1-Foci (Stewart et al., 2003) und 53BP1-Foci (Fernandez-Capetillo et al., 2002), sollte die Focibildung dieser beiden Proteine nach Induktion der pan-nukleären H2AX-Phosphorylierung untersucht werden.

Für 53BP1 zeigte sich, dass 15 Minuten nach Bestrahlung mit vier einzelnen Ionen 53BP1-Foci in den Zellkernen entstehen. Wurde jedoch eine Stunde zuvor mit einem einzelnen Ion bestrahlt, so ist der primäre 53BP1-Focus sehr deutlich zu erkennen, nicht jedoch die Foci der sekundären Bestrahlung (Abb. 42). In vielen Zellen sind die sekundären Foci nicht detektierbar, während in wenigen Zellen die Entstehung der sekundären Foci gerade noch zu erkennen ist. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass für 53BP1 die Bildung der sekundären Foci nicht vollständig unterdrückt ist, durch die erste Bestrahlung mit einem Goldion jedoch stark verringert ist. Es ist allerdings noch nicht klar, ob dieser Effekt durch eine starke Bindung von 53BP1 an den ersten Schaden zustande kommt, so dass die Menge an ungebundenem 53BP1 stark reduziert ist. Dies würde dem von Greubel et al. (2008) gezeigten Effekt einer Erschöpfung der freien 53BP1-Menge nach Bestrahlung mit leichteren Ionen entsprechen. Es wäre jedoch zunächst auch denkbar, dass die Reduktion der freien Menge an 53BP1 nach Bestrahlung mit schwereren Ionen durch eine zusätzliche Bindung von 53BP1 an

kernweites  $\gamma$ H2AX weiter reduziert wird. Da bereits in unbestrahlten Zellen das kernweite Signal von 53BP1 kaum detektierbar ist, ist nach Bestrahlung der Zellen auch nicht eindeutig erkennbar, ob sich



**Abbildung 42: Untersuchung des 53BP1-Signals nach sequentieller Bestrahlung mit Goldionen.** Humane Fibroblasten wurden an der Mikrosonde mit einem Goldion (12800 keV/ $\mu$ m) bestrahlt, eine Stunde später mit vier einzelnen Goldionen in einer Reihe bestrahlt und nach weiteren 15 Minuten fixiert. Zur Kontrolle wurden Zellkerne in anderen Bestrahlungsfeldern der gleichen Probe nur bei der zweiten Bestrahlung 15 Minuten vor Fixierung mit vier einzelnen Goldionen bestrahlt. 53BP1 (grün) und  $\gamma$ H2AX (rot) wurden angefärbt, sowie die DNA mit ToPro-3 (blau).

das kernweite 53BP1-Signal verändert hat. In der  $\gamma$ H2AX-Färbung ist erkennbar, dass die kernweite H2AX-Phosphorylierung stattgefunden hat und dass H2AX an den sekundären Schadensfoci trotzdem stärker phosphoryliert wird, als H2AX im nicht getroffenen Bereich.

Bei MDC1 hingegen zeigte sich kein derartig offensichtlicher Unterschied zwischen den Foci der ersten und der zweiten Bestrahlung (Abb. 43). MDC1 ist meistens auch an die sekundären Foci gebunden. In einzelnen Zellkernen ist die Ausbildung der sekundären MDC1-Foci jedoch verringert (Abb. 43 Pfeil). MDC1 scheint also zunächst nur geringfügig durch die kernweite H2AX-Phosphorylierung beeinflusst zu sein. Hingegen die  $\gamma$ H2AX-Foci bilden sich auch nach der zweiten Bestrahlung scheinbar vollständig aus.

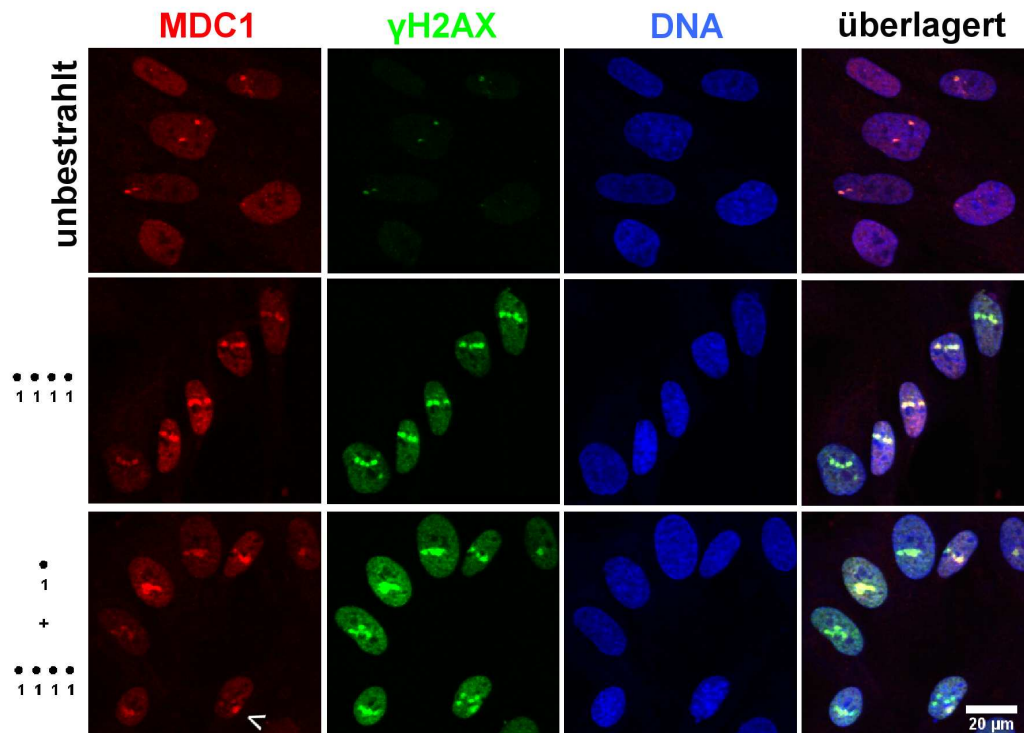
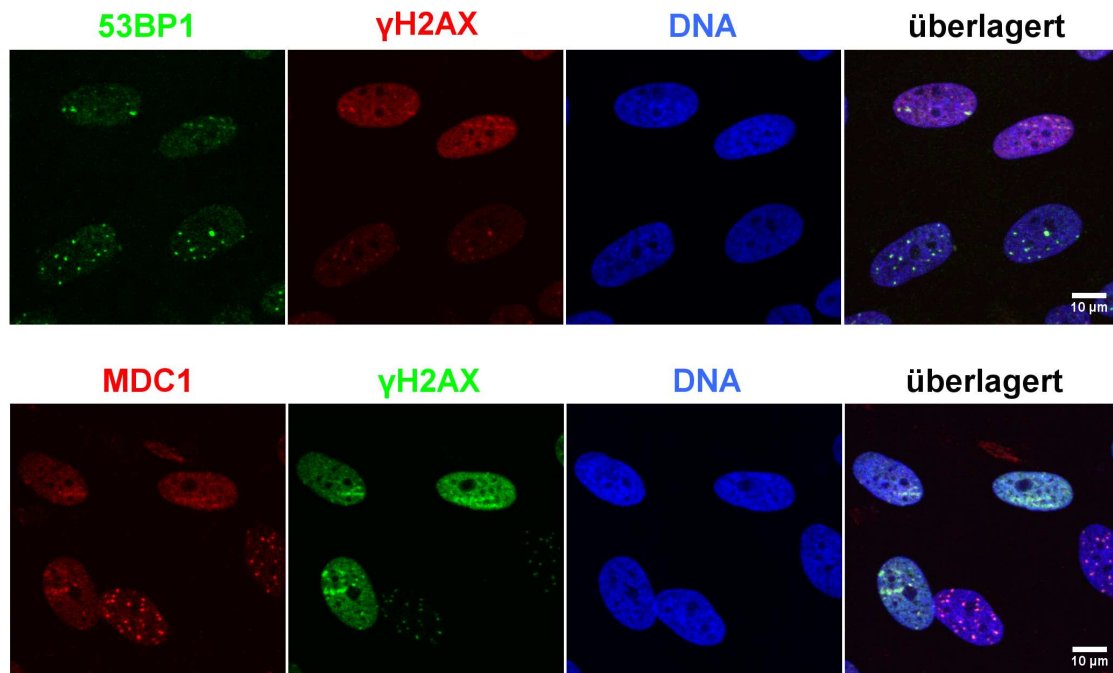


Abbildung 43: **Untersuchung des MDC1-Signals nach sequentieller Bestrahlung mit Goldionen.** Eine Stunde nach Bestrahlung mit einem Goldion (12800 keV/μm) mit der Mikrosonde wurden humane Fibroblasten erneut mit vier einzelnen Goldionen bestrahlt. 15 Minuten später wurden die Zellen fixiert und MDC1 (rot), γH2AX (grün) und die DNA (blau) mit ToPro-3 angefärbt. In weiteren Bestrahlungsfeldern der gleichen Probe wurde nur die zweite Bestrahlung mit vier einzelnen Goldionen 15 Minuten vor der Fixierung durchgeführt. Nach sequentieller Bestrahlung ist die Entstehung der sekundären MDC1-Foci in manchen Zellen verringert (Pfeil).

#### 4.8.2 Bildung von 53BP1- und MDC1-Foci nach sequentieller Bestrahlung mit Röntgen und Ionen

Wie bereits bei der Untersuchung der Kinaseabhängigkeit der γH2AX-Foci festgestellt wurde (Abschnitt 4.4.6), ist eine Beeinflussung der Foci-Bildung nach Ionenbestrahlung besonders schwer zu detektieren. Nach dicht ionisierender Bestrahlung liegt eine hohe Schadensdichte vor, so dass Unterschiede in der Proteinakkumulation unterhalb der Detektionsschwelle liegen könnten. Deshalb sollte die Entstehung der sekundären MDC1-Foci nochmals untersucht und die Ergebnisse für die Entstehung der 53BP1-Foci bestätigt werden. Allerdings wurde der zweite Schaden bei diesem Versuch durch Röntgenbestrahlung induziert. Um ersten und zweiten Schaden voneinander unterscheiden zu können, wurden wiederum unterschiedliche Bestrahlungsgeometrien verwendet. Humane Fibroblasten wurden zuerst seitlich mit Eisenionen (3050 keV/μm) bestrahlt und so die kernweite H2AX-Phosphorylierung induziert. Eine Stunde später wurden die Zellen mit 0,5 Gy Röntgenstrahlen senkrecht bestrahlt, nach 20 weiteren Minuten fixiert und 53BP1 bzw. MDC1 zusammen mit γH2AX detektiert. Durch die seitliche Bestrahlung entstehen in den Zellen Ionenspuren, die quer durch die Zellkerne verlaufen, wobei hier nicht alle Zellen getroffen werden. Durch die senkrechte Röntgenbestrahlung entstehen Foci, wobei alle Zellen gleichmäßig durch die Röntgenstrahlen bestrahlt werden. Als Kontrolle dienten also die Bereiche auf der Probe, die nicht durch Ionen getroffen wurden, sondern nur mit Röntgenstrahlen bestrahlt waren.

Es zeigte sich, dass sich sowohl deutliche 53BP1- als auch MDC1-Röntgenfoci ausbilden, wenn die Zellen zuvor nicht von Ionen getroffen wurden (Abb. 44). Wurden die Zellen jedoch zuerst mit Ionen bestrahlt, bilden sich keine detektierbaren 53BP1- oder MDC1-Röntgenfoci aus. Im direkten Ver-



**Abbildung 44: Untersuchung der 53BP1- und MDC1-Signale nach sequentieller Bestrahlung mit Ionen und Röntgenstrahlen.** Es wurden humane Fibroblasten mit Eisenionen ( $3050 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ,  $4 \cdot 10^6 \text{ T}/\text{cm}^2$ ) seitlich bestrahlt (wobei nicht alle Zellen durch Ionen getroffen werden), nach einer Stunde mit  $0,5 \text{ Gy}$  Röntgenstrahlen bestrahlt (hier werden alle Zellen gleichmäßig bestrahlt) und nach weiteren 20 Minuten fixiert. Es wurde 53BP1 (grün) zusammen mit  $\gamma\text{H2AX}$  (rot) oder MDC1 (rot) mit  $\gamma\text{H2AX}$  (grün) detektiert. Die DNA wurde mit ToPro-3 angefärbt (blau).

gleich von Zellkernen, die mit Röntgenstrahlen oder Röntgenstrahlen und Ionen bestrahlt wurden, hat es den Anschein, als ob nach Ionenbestrahlung mehr MDC1 im pan-nukleären Bereich ist als nach Röntgenbestrahlung. Da das Signal hier jedoch nicht sehr stark ist, ist keine eindeutige Aussage möglich. Es zeigt sich jedoch, dass eine erste Bestrahlung einen Einfluss sowohl auf MDC1, als auch auf 53BP1 hat.

Im Weiteren sollte überprüft werden, ob die Verminderung der Ausbildung von sekundären Röntgenfoci durch pan-nukleäres  $\gamma\text{H2AX}$  zustande kommt oder allein durch das Vorhandensein des bei der ersten Bestrahlung verursachten DNA-Schadens. Deswegen wurden Zellen sequentiell bestrahlt, allerdings wurde zuerst mit  $0,5 \text{ Gy}$  Röntgenstrahlen bestrahlt, so dass sich kein kernweites  $\gamma\text{H2AX}$ , sondern nur die Foci ausbilden würden. Nach 30 Minuten wurden die Zellen mit Eisenionen ( $3050 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ) schräg bestrahlt und nach weiteren 20 Minuten fixiert. Für 53BP1 zeigte sich, dass die primären Foci der Röntgenbestrahlung gut zu detektieren sind wie in der Kontrolle, die nur mit Röntgen bestrahlt wurde (Abb. 45). Die Ionenspuren sind nur undeutlich zu erkennen. Das lässt darauf schließen, dass der meiste Teil der im Zellkern vorhandenen Menge an 53BP1 an einen ersten Schaden bindet und relativ langsam ausgetauscht wird, unabhängig davon, ob der Schaden durch Röntgen- oder Ionenbestrahlung entstanden ist und damit unabhängig von kernweisem  $\gamma\text{H2AX}$ . Bei MDC1 sind die Röntgenfoci in den nur einmal bestrahlten Zellen deutlich detektierbar (Abb. 45). In zusätzlich mit Ionen bestrahlten Zellen sind weder die Röntgenfoci noch die Ionenspuren eindeutig zu erkennen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass MDC1 nicht so fest wie 53BP1 am ersten



Schaden gebunden ist und innerhalb der Inkubationszeit von den Foci ausgetauscht wird und an andere Bereiche im Zellkern bindet. Es ist allerdings nicht eindeutig, ob sich MDC1-Röntgenfoci und Ionenfoci nicht deutlich ausbilden können, weil insgesamt zu wenig MDC1 im Zellkern vorhanden ist, damit es in ausreichender Menge an beide Schäden binden kann oder ob es auch durch Bindung von MDC1 an das kernweite  $\gamma$ H2AX zu einer Erschöpfung an ungebundenem MDC1 kommt.

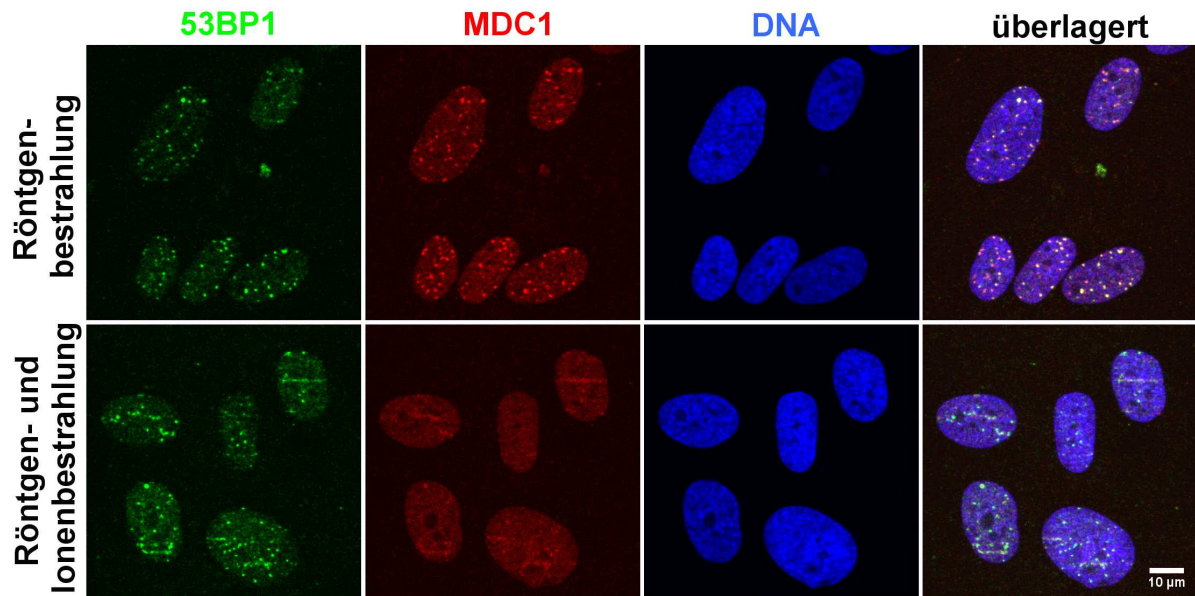
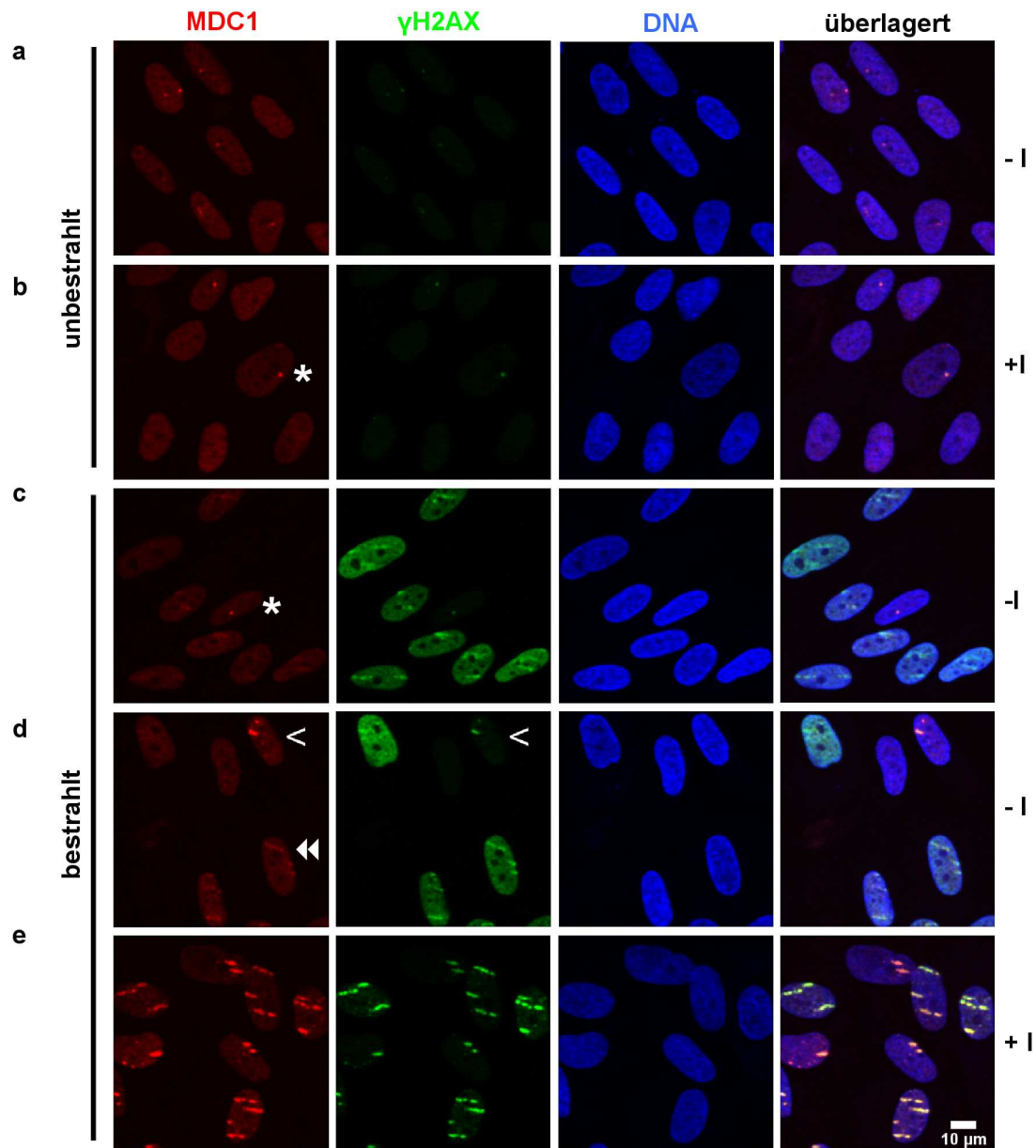


Abbildung 45: Das 53BP1- und MDC1-Signal nach sequentieller Bestrahlung mit Röntgenstrahlen und Ionen. 30 min nach Bestrahlung von humanen Fibroblasten mit 0,5 Gy Röntgenstrahlen wurden die Zellen seitlich mit Eisenionen (3050 keV/ $\mu$ m,  $4 \cdot 10^6$  T/cm<sup>2</sup>) bestrahlt und nach weiteren 20 Minuten fixiert. Oder die Zellen wurden nur mit 0,5 Gy Röntgenstrahlen bestrahlt und nach 50 Minuten fixiert. 53BP1 (grün), MDC1 (rot) wurden detektiert und die DNA (blau) mit ToPro-3 angefärbt.

#### 4.8.3 Vergleich des MDC1-Signals nach Ionenbestrahlung mit und ohne Inhibition der kernweiten H2AX-Phosphorylierung

Bei der sequentiellen Bestrahlung von humanen Fibroblasten mit Ionen und Röntgenstrahlen (vergleiche voriges Kapitel) hatte sich herausgestellt, dass die Intensität der MDC1-Foci nach Röntgenbestrahlung stark reduziert ist, wenn zuvor mit Ionen bestrahlt wurde. Allerdings ist das MDC1-Signal an der Ionenspur selbst ebenfalls nur undeutlich zu erkennen. Es sollte überprüft werden, ob dieser Effekt dadurch hervorgerufen wird, dass MDC1 an  $\gamma$ H2AX im gesamten Zellkern bindet und damit nicht in ausreichender Menge vorhanden ist, um am DNA-Schaden zu akkumulieren. Daher wurden humane Fibroblasten mit Ionen bestrahlt, aber die kernweite H2AX-Phosphorylierung durch Inhibition von ATM und DNA-PK unterdrückt. Es sollte einerseits die Signalintensität von MDC1 im unbeschädigten Bereich überprüft werden, als auch die Intensität am DNA-Schaden an der Ionenspur, um zu überprüfen, ob ohne pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX mehr MDC1 für die Bindung am DNA-Schaden zur Verfügung steht. Die Zellen wurden eine Stunde vor bis eine Stunde nach schräger Bestrahlung mit Goldionen (12800 keV/ $\mu$ m) mit ATM- und DNA-PK-Inhibitor behandelt und das MDC1- und  $\gamma$ H2AX-Signal untersucht (Abb. 46).

Das MDC1-Signal ist in den Kernen unbestrahlter Zellen relativ schwach, weshalb schwer abzuschätzen ist, ob es nach Ionenbestrahlung kernweit anders verteilt ist. Für das MDC1-Signal am



**Abbildung 46: Untersuchung des MDC1-Signals nach Ionenbestrahlung bei Unterdrückung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung durch ATM- und DNA-PK-Inhibition.** Humane Fibroblasten wurden eine Stunde vor Bestrahlung mit Goldionen ( $12800 \text{ keV}/\mu\text{m}$ ,  $3 \cdot 10^6 \text{ T}/\text{cm}^2$ ) und bis zur Fixierung eine Stunde nach Bestrahlung mit DMSO (- I) oder ATM- und DNA-PK-Inhibitor (+ I) inkubiert und MDC1 (rot) und  $\gamma\text{H2AX}$  (grün) detektiert. Die DNA wurde mit ToPro-3 (blau) gefärbt. (a) unbestrahlte Zellen ohne Inhibitor, (b) unbestrahlte Zellen mit Inhibitor, (c) und (d) bestrahlte Zellen ohne Inhibitor, (e) bestrahlte Zellen mit Inhibitor. Doppelpfeil = schwaches MDC1-Signal an der Ionenspur ohne Inhibition; Sternchen = starkes MDC1-Signal an Kontrollfoci; < = starkes MDC1-Signal an der Ionenspur bei peripheren Ionentreffern.

DNA-Schaden lassen sich jedoch mehrere Beobachtungen machen. Das MDC1-Signal an der Ionenspur ist relativ schwer zu erkennen (siehe Doppelfeil), während die Kontrollfoci in nicht getroffenen, unbestrahlten Zellen sehr gut zu detektieren sind (siehe Sternchen). Desweiteren kann beobachtet werden, dass in einzelnen Zellkernen mit peripheren Treffern, die in einer kurzen Ionenspur resultieren, das MDC1-Signal an der Ionenspur ebenfalls gut sichtbar ist (siehe <). Schließlich zeigen alle Zellen ein sehr deutliches MDC1-Signal, wenn die kernweite H2AX-Phosphorylierung durch Inhibition von ATM und DNA-PK unterdrückt wurde (Abb. 46 e). Alle diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass MDC1 immer dann stark am DNA-Schaden akkumulieren kann, wenn es nicht zur kernweiten H2AX-Phosphorylierung kommt. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass MDC1 nach Ionenbestrahlung auch im unbeschädigten Bereich der DNA an das Chromatin bindet.

#### **4.8.4 Untersuchung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung in MDC1-/- Zellen**

Da die vorangegangenen Experimente deutliche Hinweise darauf lieferten, dass MDC1 nach Ionenbestrahlung ebenfalls kernweit an das Chromatin bindet, sollte untersucht werden, ob MDC1 seinerseits die Ausbildung des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals beeinflussen kann, also ob MDC1 für die Induktion oder die vollständige Ausbildung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung benötigt wird. Es sollte weiterhin untersucht werden, ob MDC1 die Abhängigkeit der pan-nukleären H2AX-Phosphorylierung von ATM und DNA-PK beeinflusst, da gezeigt wurde, dass MDC1 die Bindung von ATM an  $\gamma$ H2AX beeinflusst (Lou et al., 2006), sowie die Autophosphorylierung von DNA-PK (S2609) (Lou et al., 2004). Zur Untersuchung dieser Fragestellung wurden MDC1-defiziente und WT MEF-Zellen nach Bestrahlung mit Uranionen (15000 keV/ $\mu$ m) untersucht. Dabei wurden die ATM- und DNA-PK-Aktivität entweder einzeln oder gleichzeitig inhibiert und die kernweite H2AX-Phosphorylierung untersucht.

Wie bereits in Kapitel 4.1.1 beschrieben, bildet sich in WT MEF Zellen ein klares kernweites  $\gamma$ H2AX-Signal aus, das jedoch in den einzelnen Zellen unterschiedlich stark ausgeprägt ist (Abb. 47). Die Kinaseabhängigkeit der kernweiten Phosphorylierung von H2AX verhält sich in MEF WT Zellen wie in humanen Fibroblasten. Erst durch gleichzeitige Inhibition von ATM und DNA-PK kann die kernweite Phosphorylierung stark verringert werden, während die Inhibition einer einzelnen Kinase die kernweite Phosphorylierung noch zulässt. In MDC1-/- Zellen kommt es ebenfalls zur kernweiten H2AX-Phosphorylierung, die jedoch schwächer ist als im WT. Das bedeutet, dass eine Bindung von MDC1 im unbeschädigten Bereich der DNA keine Voraussetzung für die Bindung von ATM und DNA-PK ist, aber wahrscheinlich bei der Verstärkung der Phosphorylierung eine Rolle spielt. Auch in MDC1-/- Zellen ist eine gleichzeitige Inhibition von ATM und DNA-PK nötig, um die kernweite Reaktion vollständig zu unterdrücken.

Das Fehlen von MDC1 beeinflusst auch das  $\gamma$ H2AX-Signal direkt an der Ionenspur. Dort ist sowohl die ATM- als auch die DNA-PK-abhängige Phosphorylierung abgeschwächt. Interessanterweise erscheint nach gleichzeitiger ATM- und DNA-PK-Inhibition das Signal am DNA-Schaden in beiden Zelllinien definierter und intensiver als ohne Inhibition. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass MDC1 keine Rolle bei der Induktion der H2AX-Phosphorylierung spielt, jedoch bei der Signalverstärkung. Dies gilt für das Signal im gesamten Zellkern, aber besonders für den Bereich direkt am DNA-Schaden.



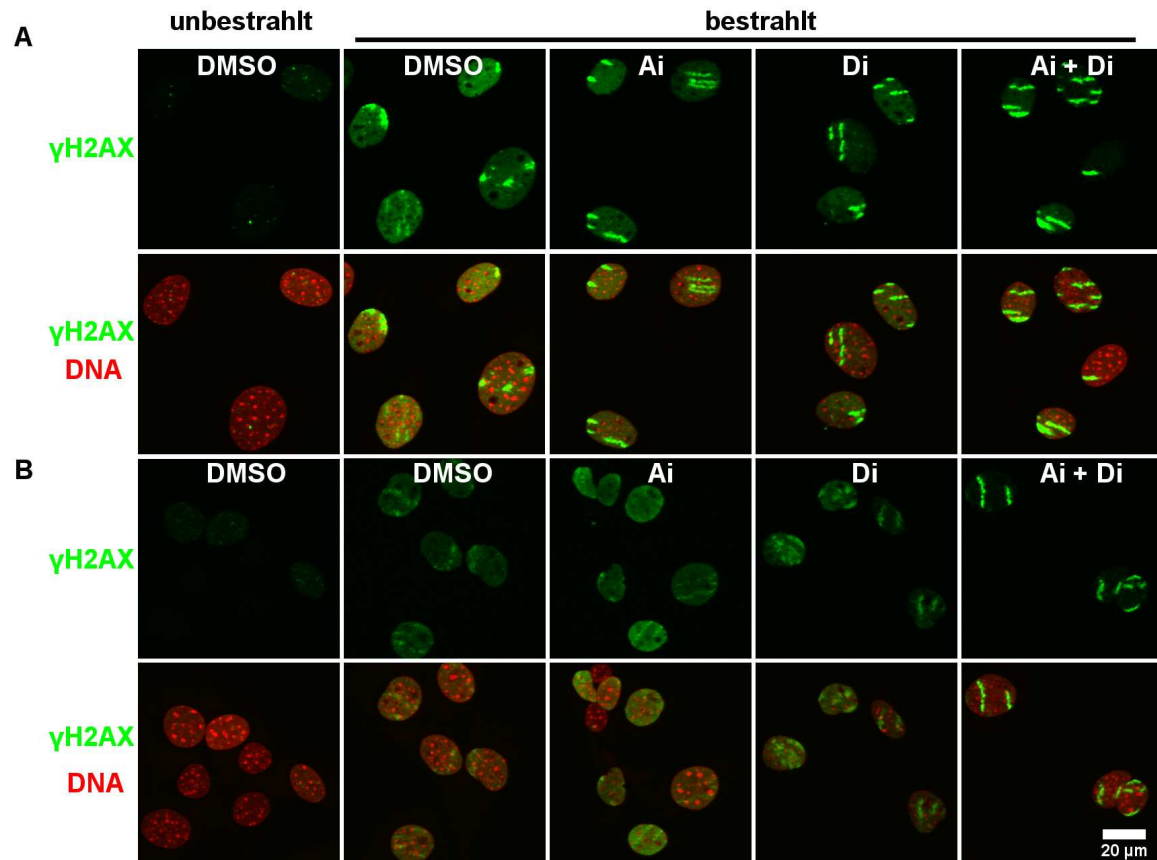


Abbildung 47: Einfluss von MDC1 auf die H2AX-Phosphorylierung und die ATM- bzw. DNA-PK-Abhängigkeit der H2AX-Phosphorylierung. (A) MEF WT Zellen und (B) MEF MDC1<sup>-/-</sup> Zellen wurden mit Uranionen (15000 keV/μm,  $3 \cdot 10^6$  T/cm<sup>2</sup>) bestrahlt, eine Stunde nach Bestrahlung fixiert und γH2AX (grün) und die DNA mit ToPro-3 (rot) angefärbt. Die Zellen wurden entweder mit DMSO, ATM-Inhibitor (Ai), DNA-PK-Inhibitor (Di) oder beiden Inhibitoren (Ai + Di) eine Stunde vor Bestrahlung und bis zur Fixierung inkubiert.

## 5 Diskussion

### 5.1 Entstehung von $\gamma$ H2AX im unbeschädigten Bereich des Chromatins nach Schwerionenbestrahlung

Untersuchungen der  $\gamma$ H2AX-Foci, die nach Schwerionenbestrahlung am DNA-Schaden entlang der Ionenspur entstehen, ergaben Hinweise darauf, dass ein zusätzliches kernweites  $\gamma$ H2AX-Signal in bestrahlten Zellen vorhanden war, das die Analyse der  $\gamma$ H2AX-Foci erschwerte (Jakob et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit wurde diese neuartige kernweite Antwort auf ionisierende Bestrahlung erstmals charakterisiert, indem die Regulierung der pan-nukleären H2AX-Phosphorylierung, sowie seine mögliche Bedeutung untersucht wurden. Bei der folgenden Betrachtung und Bewertung der Ergebnisse wird ein besonderes Augenmerk auf den Vergleich mit den kernweiten Antworten in anderen Stresssituationen gelegt, neben dem Vergleich mit lokaler H2AX-Phosphorylierung an DSBs. Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden die Zellen bei nicht gezielter Bestrahlung am Linearbeschleuniger mit Ionen im Energiebereich von unter 10 MeV/u bestrahlt und bei gezielter Bestrahlung an der Mikrosonde mit Ionen einer Energie von 4.8 MeV/u. Bei diesen Energien entstehen die sekundären Elektronen und damit die Ionisationsereignisse nur direkt um die Flugbahn des Ions herum. Der Hauptanteil der Dosis wird im Nanometerbereich (siehe Abb. 3) um die Flugbahn des Ions deponiert. Da auch der Diffusionsweg der entstehenden Radikale in der Zelle wenige Nanometer beträgt (Hall und Giaccia, 2006), kann davon ausgegangen werden, dass sich außerhalb der Ionenspur nur einzelne DNA-Schäden befinden, die durch endogene Prozesse entstehen können. Das bedeutet also, dass das in dieser Arbeit charakterisierte pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal größtenteils im unbeschädigten Bereich der DNA auftritt.

Es wurde gezeigt, dass das  $\gamma$ H2AX-Signal spezifisch ist. Mit Hilfe zwei verschiedener anti- $\gamma$ H2AX-Antikörper konnte das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal detektiert werden und in einer H2AX-defizienten MEF-Zelllinie war kein kernweites Signal nachweisbar (Abb. 13). Es konnte daher ausgeschlossen werden, dass die Antikörper die phosphorylierte Form eines anderen Proteins erkennen, das kernweit nach Schwerionenbestrahlung entstehen könnte. Desweiteren wurde überprüft, ob es sich bei der kernweiten Antwort um einen Prozess handelt, der nur in bestimmten Zelllinien auftritt. Es zeigte sich, dass die pan-nukleäre H2AX-Phosphorylierung in allen untersuchten Zelllinien auftrat, von normalen humanen Fibroblasten, über Tumorzellen, bis hin zu Maus- und Nagerzellen (Abb. 12). Dies lässt darauf schließen, dass die kernweite Reaktion nach Ionenbestrahlung in verschiedenen Spezies konserviert ist. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit in der Literatur beschriebenen kernweiten Antworten, die nicht durch ionisierende Bestrahlung ausgelöst wurden. Nach Transfektion von DNA-Fragmenten wurde ein kernweites  $\gamma$ H2AX-Signal ebenfalls in verschiedenen Zelltypen, wie normalen Fibroblasten, Tumorzellen und Hamsterzellen gezeigt (Quanz et al., 2009b). Auch nach Behandlung mit hypotoner Lösung reagieren Zellen aus verschiedenen Spezies und aus verschiedenen Geweben mit einer pan-nukleären Phosphorylierung von H2AX (Baure et al., 2009). Es wurde überprüft, ob es sich bei kernweit auftretendem  $\gamma$ H2AX um möglicherweise während oder nach der Reparatur ausgetauschtes Histon handelt. Shibata et al. (2011) zeigen, dass die DSB-Reparatur mit steigender Komplexität der DNA-Schäden verlangsamt ist und da das kernweite Signal bereits eine Stunde nach Bestrahlung deutlich sichtbar ist, also zu einem Zeitpunkt, zu dem nach Schwerionenbestrahlung noch wenig Reparatur stattfinden konnte, erschien es unwahrschein-

lich, dass es sich um bei der Reparatur ausgetauschtes Histon handelt. Das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal erwies sich als resistent gegenüber der Extraktion von löslichem Protein vor der Fixierung (Abb. 14 A). Auch bei der Analyse mittels Proteinfractionierung zeigte sich, dass  $\gamma$ H2AX vollständig im Chromatin lokalisiert ist und kein  $\gamma$ H2AX-Signal in der Nukleoplasmafraktion vorhanden ist (Abb. 14 B). Diese Ergebnisse zeigen also eindeutig, dass nach Ionenbestrahlung  $\gamma$ H2AX nicht durch den Zellkern diffundiert, sondern dass auch H2AX im unbeschädigten Bereich des Chromatins phosphoryliert wird. Bei den Untersuchungen ähnlicher Stressantworten wurde der Fragestellung nach der Chromatingebundenheit teilweise ebenfalls nachgegangen. Es wurde durch Analyse mitotischer Zellen mit kondensiertem Chromatin gezeigt, dass nach Transfektion von DNA-Fragmenten das kernweite  $\gamma$ H2AX ebenfalls Chromatin-gebunden ist (Quanz et al., 2009b). Apoptotisches  $\gamma$ H2AX wurde zwar auch nach Proteinfractionierung im Cytoplasma und Nukleoplasma gefunden (Solier und Pommier, 2009), das könnte jedoch eine Folge der starken Fragmentierung der DNA und des Abbaus der Kernmembran sein.

Es konnte also gezeigt werden, dass H2AX kernweit im Chromatin nach Induktion komplexer DNA-Schäden phosphoryliert wird und dass dies eine Reaktion ist, die in allen untersuchten Zelllinien beobachtet werden konnte. Dies ist ein Prozess, der in Zusammenhang mit ionisierender Strahlung noch nicht beschrieben wurde und für den die zugrunde liegenden Mechanismen noch völlig ungeklärt sind. Da dieser Prozess durch die bisher bekannten Funktionen von  $\gamma$ H2AX der Akkumulation von Reparaturfaktoren und Verbesserung der Effizienz der DNA-Reparatur zunächst nicht zu erklären ist, sollte diese Antwort weiter charakterisiert werden, da dies zum Verständnis der biologischen Wirksamkeit von Ionenstrahlung beitragen und damit für die Therapie mit Ionenstrahlen von Bedeutung sein könnte.

## 5.2 Die Regulierung der pan-nukleären H2AX-Phosphorylierung

### 5.2.1 Dosisabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung

Da die kernweite H2AX-Phosphorylierung bisher nicht nach Röntgenstrahlung, sondern nur nach Bestrahlung mit schweren Ionen beobachtet wurde, sollte überprüft werden, ob diese Antwort erst nach einer bestimmten Schwellendosis induziert wird und ob sie nach dem Alles-oder-Nichts-Prinzip verläuft oder die Stärke der Phosphorylierung von der Dosis abhängig ist. Dies wurde durch gezielte Bestrahlung von einzelnen Zellkernen mit einer genau definierten Anzahl an Ionen mit der Mikrosonde und durch anschließende Quantifizierung der Intensität des kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signals nach Immunfluoreszenzfärbung untersucht. Es konnte eindeutig gezeigt werden, dass die kernweite Antwort direkt von der Dosis abhängig ist, da die H2AX-Phosphorylierung mit zunehmender Dosis ansteigt. Diese Abhängigkeit zeigte sich für alle untersuchten Ionen von Kohlenstoff (290 keV/ $\mu$ m), über Stickstoff (400 keV/ $\mu$ m) und Nickel (3800 keV/ $\mu$ m) bis zu Gold (12800 keV/ $\mu$ m) und damit für einen großen Dosisbereich von 0,19 Gy (1 Kohlenstoffion) bis 68 Gy (8 Goldionen) (Abb. 22). Diese Ergebnisse sprechen für einen direkten Zusammenhang zwischen der Menge der induzierten DNA-Schäden und der Stärke der H2AX-Phosphorylierung im nicht getroffenen Bereich. Das bedeutet, dass durch die lokal begrenzten DNA-Schäden mengenabhängig ein Signal induziert wird, das direkt auf das Chromatin im gesamten Zellkern übertragen wird.

Durch gezielte Bestrahlung der Zellkerne oder des Cytoplasmas wurde gezeigt, dass die kernweite

H2AX-Phosphorylierung nur nach Bestrahlung der Zellkerne auftritt (Abb. 19) und somit wahrscheinlich die Induktion von DNA-Schäden und nicht die Schädigung von Proteinen beispielsweise in der Cytoplasmamembran der Auslöser für die kernweite Reaktion ist.

Schon bei sehr geringen Dosen nach Bestrahlung mit einzelnen Kohlenstoffionen (0,19 Gy/Ion) oder Stickstoffionen (0,27 Gy/Ion) ist eine geringe Erhöhung des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals messbar. Dieses Signal war zwar durch die verwendete Methode messbar, bei Betrachtung im Mikroskop aber nicht erkennbar (Abb. 23). Dass hier bereits die kernweite Schadensantwort einsetzt, wird jedoch dadurch bestätigt, dass bei weiterer geringer Zunahme der Dosis, bei Bestrahlung mit 2 und 4 Kohlenstoffionen bzw. 2 und 3 Stickstoffionen das Signal weiter ansteigt. Es wird also klar gezeigt, dass keine Schwellendosis nötig ist, um die kernweite H2AX-Phosphorylierung zu induzieren. Dieses Ergebnis könnte darauf hindeuten, dass es sich bei dieser Antwort um eine generelle Schadensantwort handelt, die in geringem Maß auch bei locker ionisierender Bestrahlung auftreten könnte, aber erst nach Bestrahlung mit hohen lokalen Dosen messbar bzw. sichtbar ist.

Bei Bestrahlung mit höheren Dosen wurde die pan-nukleäre H2AX-Phosphorylierung noch weiter verstärkt. Allerdings war der Signalanstieg nicht linear, sondern wurde bei Zunahme der Dosis langsamer, so dass sich ein kurvenartiger Verlauf der Intensität über die Dosis ergab. Dies könnte dadurch zustande kommen, dass  $\gamma$ H2AX in den Bereich der Sättigung kommt und damit nicht mehr genügend unphosphoryliertes Histon zur Verfügung steht. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass bei Bestrahlung mit 8 Goldionen (68 Gy) das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal meist nicht so stark ausgeprägt war, wie das  $\gamma$ H2AX-Signal an den Foci (Abb. 23), was dafür spricht, dass  $\gamma$ H2AX im untersuchten Dosisbereich noch nicht gesättigt war. Es gibt allerdings Hinweise darauf, dass eine Sättigung der Menge der durch die DNA-Schäden aktivierten Enzyme eine Rolle spielen könnte (vergleiche Kapitel 5.2.3).

In allen Messungen liegt eine breite Verteilung der Intensitäten vor mit Standardabweichungen zwischen ungefähr 30 % und 50 %, obwohl mit einer sehr exakten Bestrahlungsmethode und einer Quantifizierungsmethode unter optimierten Bedingungen gearbeitet wurde (vergleiche Kapitel 3.1.8 und Kapitel 4.1.5). Es stellt sich die Frage, warum einzelne Zellen unterschiedlich stark auf die gleiche Behandlung reagieren. Mögliche Unterschiede durch verschiedene Zellzyklusphasen konnten weitgehend ausgeschlossen werden, da die untersuchten Zellen konfluent, also größtenteils in der G0/G1-Phase waren. Eine mögliche Erklärung für diese Heterogenität könnte ein Unterschied in der pro Zellkern erreichten Dosis sein. Denn trotz Bestrahlung der einzelnen Zellkerne mit der gleichen Anzahl an Ionen mit Hilfe der Mikrosonde kann sich die Strecke, die das Ion durch den Zellkern zurücklegt, je nach Dicke der einzelnen Zellkerne unterscheiden. Die Höhe der Zellkerne von Fibroblasten ist mit ungefähr 3  $\mu$ m relativ gering und sollte im Vergleich zu anderen Zelllinien weniger stark streuen. Auch der Auftreffpunkt der Ionen innerhalb des Zellkerns kann eine Rolle spielen, da bei einem zentralen Treffer die im Kern zurückgelegte Strecke des Ions größer sein sollte, als bei Bestrahlung am Rand. Da bei Bestrahlung mit der Mikrosonde automatisch das Zentrum des Kerns angesteuert wurde und die Genauigkeit der Mikrosonde, den markierten Punkt zu treffen, bei  $670 \pm 400$  nm liegt (Voss et al., 2011), wird auch hier nur ein geringer Effekt erwartet. Eine weitere Erklärung könnte die in einzelnen Zellen unterschiedliche Menge an Protein wie beispielsweise H2AX oder der verantwortlichen Kinasen sein. Im Rahmen eines während dieser Arbeit von mir betreuten Praktikums (absolviert von Frau Bettina Kass) konnte gezeigt werden, dass die Menge an ATM und

DNA-PK zwischen einzelnen Zellen ebenfalls einer Verteilung folgt mit Standardabweichungen von ungefähr 20 bis 30 %. Diese Individualität einzelner Zellen kommt bei der verwendeten Quantifizierungsmethode anders als bei biochemischen Methoden wie beispielsweise Immunoblot Analyse besonders zum Ausdruck. Trotz der beobachteten Unterschiede zwischen einzelnen Zellen zeigte sich durch die oben beschriebenen Untersuchungen jedoch deutlich, dass es sich bei der kernweiten Antwort nach Ionenbestrahlung nicht um eine Alles-oder-Nichts-Reaktion handelt.

Auch bei den in der Literatur beschriebenen Fällen von kernweiter H2AX-Phosphorylierung zeigte sich teilweise eine Abhängigkeit von der Stärke der Behandlung. Baure et al. (2009) beobachteten nach Behandlung mit hypotoner Lösung Zellen mit schwachem, mittleren und starkem kernweiten  $\gamma$ H2AX-Signal. Die Autoren geben an, dass längere Inkubation mit hypotonem Puffer den Anteil an Zellen mit  $\gamma$ H2AX-Signal erhöht. Bakkenist und Kastan (2003) konnten nach Behandlung mit schwächerer hypotoner Lösung keine Induktion von  $\gamma$ H2AX feststellen. Dies deutet weiter darauf hin, dass nach hypotonem Stress die Stärke der H2AX-Phosphorylierung von der Stärke der vermutlich dadurch induzierten Chromatinstrukturveränderung abhängt. Bei der H2AX-Phosphorylierung nach Transfektion von DNA-Fragmenten scheint es sich hingegen um eine Alles-oder-Nichts-Reaktion zu handeln (Quanz et al., 2009b). Obwohl eine Gauß-Verteilung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente in den Zellen nach Transfektion beobachtet wurde, ließen sich die Zellen anhand der Stärke des  $\gamma$ H2AX-Signals in zwei getrennte Populationen einteilen. In diesem Punkt unterscheidet sich die von Quanz et al. (2009b) beschriebene Antwort also klar von der durch Ionenbestrahlung induzierten kernweiten Antwort.

Für viele der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden mehrere Ionen mit der Mikrosonde in einen Punkt in den Zellkern gezielt. Es ist möglich, dass sich die Dosis durch nahe beieinander liegende Treffer aufsummiert und dadurch die Komplexität der DNA-Schäden in den überlappenden Bereichen erhöht ist im Vergleich zu vollständig getrennten Ionenspuren. Bei Bestrahlung mit der Mikrosonde besitzen die Ionen eine Energie von 4.8 MeV/u, so dass sich die Dosis für einzelne Ionenspuren beispielsweise für Kohlenstoffionen anhand des radialen Dosisprofils (siehe Abb. 3) abschätzen lässt. 20 nm vom Zentrum der Ionenspur entfernt liegt die lokale Dosis ungefähr im Bereich von 1000 Gy, bei 100 nm ungefähr bei 100 Gy, bei 200 nm bei 10 Gy. Wenn also zwei Ionen im Abstand von 200 nm auftreten, ist die höchste überlappende Dosis bei 100 nm, also zweimal 100 Gy. Dabei handelt es sich um eine hohe lokale Dosis, die aber deutlich geringer ist als die Dosis im Zentrum der Ionenspur mit mehreren 1000 Gy. Zu der radialen Dosisverteilung der Ionenspur kommt die Diffusion der Radikale, die zur seitlichen Ausbreitung der Ionisationsereignisse führen sollte, allerdings beschränkt sich die Diffusionsstrecke der Radikale in der Zelle auf wenige Nanometer. Bei Bestrahlung mit der Mikrosonde in einen Punkt liegen alle Treffer in einem Bereich mit einem Durchmesser von ungefähr 600 nm (Voss et al., 2011), was bedeutet, dass sich die Ionenspuren bei mehreren Treffern mit hoher Wahrscheinlichkeit zumindest am Rand der einzelnen Ionenspuren überlagern. Um zu untersuchen, ob diese Überlagerung die kernweite Reaktion beeinflusst, wurden mit der Mikrosonde mehrere Ionen in einen Punkt gezielt oder auf mehrere Punkte im Zellkern aufgeteilt. In den durchgeführten Experimenten war jedoch kein eindeutiger Einfluss der räumlichen Verteilung der Ionen auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung feststellbar. Während nach Bestrahlung mit 4 Kohlenstoffionen das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal bei Bestrahlung im Punkt leicht erhöht war (Abb. 24 A), war nach Bestrahlung mit verschiedenen Anzahlen Chromionen das

Signal bei verteilten Treffern etwas stärker (Abb. 24 B). Das bedeutet, dass die kernweite Reaktion wahrscheinlich hauptsächlich durch den entstandenen DNA-Schaden im Zentrum der Ionenspur ausgelöst wird. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass für eine Bestrahlung mit einer sehr hohen Anzahl an Ionen im Punkt, so viele Bereiche überlappender Ionenspuren entstehen, dass ein Effekt für die kernweite Phosphorylierung zustande kommt.

Die Untersuchungen ergeben eindeutig, dass die kernweite Antwort mit zunehmender Dosis und damit zunehmender Menge an DNA-Schäden ansteigt und bei höheren Dosen der Signalanstieg abflacht, wobei einzelne Zellen unterschiedlich stark reagieren. Anhand der Untersuchungen kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Prozess auch bei locker ionisierender Bestrahlung stattfindet. Wahrscheinlich wäre die kernweite Phosphorylierung dann aber nur sehr gering, da sie offenbar hauptsächlich durch die hohen lokalen Dosen im Zentrum der Ionenspur ausgelöst wird. Die kernweite Reaktion sollte also vor allem bei Ionenbestrahlung relevant sein.

### **5.2.2 Zeitlicher Verlauf der kernweiten Antwort**

Es wurde der zeitliche Verlauf der H2AX-Phosphorylierung untersucht, da überprüft werden sollte, ob das entstandene  $\gamma$ H2AX-Signal erhalten bleibt, weiter ansteigt oder wieder zurückgebildet wird und ob der Verlauf mit der Kinetik der  $\gamma$ H2AX-Foci vergleichbar ist. Es konnte klar gezeigt werden, dass die Phosphorylierung innerhalb der ersten Stunde nach Bestrahlung ansteigt und dann wieder abnimmt. Die Zeitabhängigkeit wurde nach Kohlenstoff- (7,7 Gy), Stickstoff- (3,8 Gy) und Goldionenbestrahlung (17 Gy) untersucht (Abb. 25). In allen drei Fällen geht die Phosphorylierung von H2AX mit sehr ähnlicher Geschwindigkeit zurück und bleibt mit ca. 25 bis 28 % des maximalen  $\gamma$ H2AX-Signals auf einem leicht erhöhten Niveau gegenüber den unbestrahlten Kontrollen. Dieses Ergebnis zeigt, dass der zeitliche Verlauf der H2AX-Phosphorylierung nicht von der Menge der induzierten DNA-Schäden oder deren Komplexität abhängt, obwohl wie im vorigen Kapitel diskutiert die Stärke der H2AX-Phosphorylierung eindeutig von der Dosis abhängig ist.

Dieses Ergebnis deutet bereits darauf hin, dass wahrscheinlich kein Zusammenhang zwischen der Kinetik der kernweiten H2AX-Phosphorylierung und der Kinetik der  $\gamma$ H2AX-Foci besteht, da besonders bei Bestrahlung mit Goldionen wegen des sehr hohen LETs eine langsamere DSB-Reparatur erwartet werden kann als nach Bestrahlung mit niedrigerem LET. Denn die Analyse von DNA-Fragmenten nach Bestrahlung von Zellen mit Calciumionen und Röntgenstrahlen zeigte, dass die Reparatur von DNA-Fragmenten nach dicht ionisierender Bestrahlung deutlich verringert ist im Vergleich zu locker ionisierender Strahlung (Taucher-Scholz et al., 1996). Auch die Untersuchungen der DSB-Reparatur durch Detektion von  $\gamma$ H2AX-Foci lassen eine verlangsamte Reparatur nach Bestrahlung mit höherem LET und damit höherer Komplexität der Schäden erkennen (Kitajima et al., 2010; Shibata et al., 2011). Um einen direkten Vergleich zwischen der Kinetik des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals und der  $\gamma$ H2AX-Foci nach Ionenbestrahlung zu ermöglichen, wurde mit einem Ion mit vergleichsweise geringem LET bestrahlt und ein spezielles Bestrahlungsmuster an der Mikrosonde gewählt. Die Bestrahlung erfolgte mit Stickstoffionen, da bei niedrigerem LET die  $\gamma$ H2AX-Foci weniger DSBs beinhalten als bei Bestrahlung mit höherem LET, so dass die Reparatur genauer nachzuvollziehen ist. Es wurden 10 Ionen in einen zentralen Punkt gezielt, um die kernweite Reaktion zu induzieren und 4 einzelne Ionen daneben gezielt, um anhand der einzelnen Treffer die Reparatur zu verfolgen. Allerdings war nach längeren Inkubationszeiten ein Auseinanderdriften von

übereinandergelagerten  $\gamma$ H2AX-Signalen zu verzeichnen und eine klare Zuordnung der einzelnen Treffer nicht mehr möglich. Um dieses Problem zu umgehen, wurden das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal und die  $\gamma$ H2AX-Foci in getrennten Experimenten analysiert. Für die Quantifizierung der Foci wurden die Zellen schräg mit Kohlenstoff- oder Goldionen mit gleicher Fluenz bestrahlt und bis 24 Stunden nach Bestrahlung analysiert. Nach Kohlenstoff-Bestrahlung konnte die Menge der  $\gamma$ H2AX-Foci per Auge ausgezählt werden (Abb. 25 D). Allerdings ist das Auszählen mit Schwierigkeiten verbunden, da durch die hohe Dichte der Ionisationsereignisse häufig nicht klar voneinander getrennte Foci entstehen. Die Auswertung erlaubte also nur eine Abschätzung der Reparatur. Die erhaltenen Anzahlen an  $\gamma$ H2AX Foci sind in Übereinstimmung mit bereits gezeigten Kinetiken nach Kohlenstoffbestrahlung (Fournier et al., 2009), andere Studien zeigten jedoch eine langsamere Reparatur der DSBs nach Kohlenstoffbestrahlung (Shibata et al., 2011), was weiter darauf hindeuten könnte, dass durch die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Anzahlen an  $\gamma$ H2AX-Foci die Anzahl an DNA-Schäden eher unterschätzt wurde. Da die Anzahlen der  $\gamma$ H2AX-Foci nicht direkt mit den Intensitätswerten des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals vergleichbar sind, wurden die erhaltenen Anzahlen der Foci und die Intensitätswerte des kernweiten Signals jeweils auf den Wert bei einer Stunde normiert. So konnte der prozentuale Anteil des verbleibenden Signals zu verschiedenen Zeitpunkten verglichen werden. Nach Kohlenstoffbestrahlung sind die Kinetiken des pan-nukleären Signals und der Foci ähnlich, wobei für das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal zwischen 3 und 12 Stunden ein etwas schnellerer Rückgang des prozentualen Anteils zu verzeichnen ist als für die  $\gamma$ H2AX-Foci. Es lässt sich jedoch anhand dieses Ergebnisses nicht ausschließen, dass beide Mechanismen, Reparatur und pan-nukleäre Phosphorylierung, miteinander zusammenhängen. Für Goldbestrahlung wird jedoch wie bereits erwähnt wegen des höheren LETs eine langsamere Reparatur erwartet als nach Kohlenstoffbestrahlung. Eine Auszählung der Foci war hier jedoch nicht möglich, da die einzelnen  $\gamma$ H2AX-Foci meist nicht mehr erkennbar sind, sondern zu zusammenhängenden Signalen verschmelzen. Anhand der Immunfluoreszenzfärbung wird jedoch in Übereinstimmung mit Analysen von Jakob et al. (2009) sichtbar, dass das  $\gamma$ H2AX-Signal an der Ionenspur auch nach 24 Stunden größtenteils erhalten bleibt, während nach Kohlenstoffbestrahlung eine starke Reduktion der  $\gamma$ H2AX-Foci zu diesem Zeitpunkt sichtbar ist (Abb. 26). Das pan-nukleäre Signal geht allerdings nach Goldbestrahlung mit gleicher Geschwindigkeit zurück wie nach Kohlenstoffbestrahlung. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Rückbildung von pan-nukleärem  $\gamma$ H2AX anders reguliert wird als die Rückbildung der  $\gamma$ H2AX-Foci, was darauf hindeutet, dass die Reparatur von DSBs keine Voraussetzung für den Rückgang des kernweiten Signals ist.

Diese neuen Erkenntnisse über die relativ schnelle Rückbildung des  $\gamma$ H2AX-Signals werfen die Frage auf, wie der Rückgang von pan-nukleärem  $\gamma$ H2AX reguliert wird. Eine allgemeine Hochregulierung der für die Dephosphorylierung von  $\gamma$ H2AX verantwortlichen Phosphatasen ist eher unwahrscheinlich, da das  $\gamma$ H2AX-Signal an den Foci erhalten bleibt. Es wäre jedoch möglich, dass das auslösende Signal der kernweiten Antwort zumindest genau so schnell oder sogar etwas früher zurückgebildet wird als das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal. Falls DSBs *per se* die Auslöser der kernweiten Reaktion wären, würde man keinen derartig schnellen Rückgang der kernweiten Antwort besonders bei hohem LET erwarten. Möglicherweise stehen andere Vorgänge mit der Rückbildung des kernweiten Signals im Zusammenhang, beispielsweise eine Prozessierung der DNA-Enden (vergleiche Kapitel 5.4.3).

Quanz et al. (2009b) zeigten, dass nach Transfektion von DNA-Fragmenten ebenfalls eine kernweite H2AX-Phosphorylierung induziert wird. Die Autoren konnten in ihren Untersuchungen das zeitliche Auftreten von  $\gamma$ H2AX mittels Western Blot Analyse mit der Menge der in den Zellen vorhandenen DNA-Fragmente vergleichen, da diese mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt waren. Die Autoren zeigen ein Maximum von  $\gamma$ H2AX fünf Stunden nach der Transfektion, das mit einem Maximum der DNA-Fragmente korreliert. Anschließend kommt es zu einer starken Reduktion der DNA-Fragmente, die nach 24 Stunden gemessen wurde, während  $\gamma$ H2AX zu diesem Zeitpunkt noch verbleibt. Vier Tage nach Transfektion ist noch eine restliche Menge an DNA-Fragmenten und  $\gamma$ H2AX detektierbar. Das  $\gamma$ -H2AX-Signal geht also ebenfalls zurück, jedoch ist sowohl der Anstieg, als auch der Rückgang von  $\gamma$ H2AX langsamer gegenüber der Kinetik nach Ionenbestrahlung. Der langsamere Signalanstieg hängt wahrscheinlich damit zusammen, dass bei Transfektion die DNA-Fragmente eine gewisse Zeit benötigen, um in den Zellkern zu gelangen, während nach Ionenbestrahlung sofort DNA-Schäden vorhanden sind und die unmittelbare Schadensantwort direkt ausgelöst wird. Der langsamere Rückgang von  $\gamma$ H2AX könnte dadurch zustande kommen, dass die für die Transfektion von Quanz et al. (2009b) verwendeten DNA-Fragmente nicht abbaubar sind, da die beiden DNA-Stränge an einem Ende über einen Hexaethylglykol-Linker verbunden sind und das andere Ende durch ein Phosphorothioat-modifiziertes Nukleotid geschützt ist (Quanz et al., 2009a). Möglicherweise gehen die DNA-Fragmente in diesem Fall erst über Zellteilung verloren oder können nur sehr langsam und ineffizient abgebaut werden. Die von Quanz et al. (2009a) beobachtete Verzögerung des Rückgangs von  $\gamma$ H2AX gegenüber der Fragmente, könnte damit zusammenhängen, dass möglicherweise der Schwellenwert für das Auslösen der Reaktion erst nach vier Tagen unterschritten wird, falls die DNA-Fragmente in starkem Überschuss transfiziert wurden. Nach Reparatur von DSBs ist die Dephosphorylierung der  $\gamma$ H2AX-Foci nur leicht in einem Zeitraum von ungefähr einer Stunde verzögert gegenüber der Ligation der DNA-Enden (Kinner et al., 2008; Rothkamm und Horn, 2009). Bei Ionenbestrahlung wäre denkbar, dass die kernweite Dephosphorylierung von  $\gamma$ H2AX ebenfalls verzögert ist im Vergleich zum Abbau des auslösenden Signals, so dass dieser Abbau innerhalb der ersten Stunde nach Bestrahlung beginnen müsste.

Der zeitliche Verlauf der durch Behandlung mit hypotoner Lösung induzierten kernweiten H2AX-Phosphorylierung wurde ebenfalls untersucht (Baure et al., 2009). Bereits 10-minütige hypotone Behandlung mit anschließender 30-minütiger Inkubation in isotonem Medium war ausreichend, um ein kernweites  $\gamma$ H2AX-Signal zu induzieren. Durch eine längere Inkubationszeit in hypotonem Medium konnte das Signal noch weiter erhöht werden und selbst in der 2-stündigen Erholungszeit in isotonem Medium stieg das Signal weiter an. Es kommt also wie nach Schwerionenbestrahlung zu einem schnellen Anstieg der Phosphorylierung nach dem Auslösen der Stresssituation. Ob nach hypotoner Behandlung eine Dephosphorylierung passiert und in welchem Zeitrahmen diese stattfindet, ist noch unklar. Der weitere Signalanstieg nach dem Mediumwechsel lässt jedoch vermuten, dass die durch hypotonen Stress ausgelöste Chromatinstrukturveränderung nicht so schnell verarbeitet wird wie das für die kernweite Reaktion nach Schwerionenbestrahlung verantwortliche Signal. Es zeigte sich also, dass die kernweite H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung nur transient auftritt und nur innerhalb der ersten Stunden nach Bestrahlung vollständig ausgeprägt ist. Das bedeutet, dass die biologischen Konsequenzen, die sich möglicherweise aus dieser Reaktion ergeben, ebenfalls hauptsächlich in diesem Zeitraum relevant sein sollten. Darüber hinaus muss das Auftreten



dieses zusätzlichen  $\gamma$ H2AX-Signals bei der Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX berücksichtigt werden, beispielsweise bei der automatischen Detektion von  $\gamma$ H2AX-Foci, bei der das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal zu kurzen Zeiten oberhalb des für die Detektion der Foci eingestellten Schwellenwertes liegen könnte. Auch bei der Quantifizierung von  $\gamma$ H2AX mit Hilfe von Methoden wie Durchflusszytometrie und Western Blot Analyse, die das gesamte  $\gamma$ H2AX-Signal erfassen, ist es unbedingt empfehlenswert, diese Analysen nach Ionenbestrahlung durch mikroskopische Techniken zu ergänzen.

### 5.2.3 Kinaseabhängigkeit der kernweiten Antwort

ATM, ATR und DNA-PK sind die Kinasen, die H2AX hauptsächlich phosphorylieren, allerdings werden die drei Kinasen durch unterschiedliche Mechanismen aktiviert (vergleiche Kapitel 2.4). Um den Mechanismus der kernweiten H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung zu verstehen, war es daher interessant zu untersuchen, durch welche der Kinasen H2AX kernweit phosphoryliert wird. In dieser Arbeit konnte eindeutig durch Verwendung von spezifischen Inhibitoren und Kinase-defizienten Zelllinien gezeigt werden, dass die durch Schwerionenbestrahlung ausgelöste kernweite H2AX-Phosphorylierung von DNA-PK und ATM durchgeführt wird. Erst bei Inhibierung der Aktivität beider Kinasen wird die Ausbildung von kernweisem  $\gamma$ H2AX unterdrückt (Abb. 30). Das bei Koffein-Behandlung beobachtete restliche  $\gamma$ H2AX-Signal könnte dadurch zustande kommen, dass wie mittels Western Blot Analyse gezeigt, ATM durch Koffeinbehandlung nicht so effizient inhibiert werden konnte wie durch den spezifischen ATM-Inhibitor (Abb. 28). DNA-PK-defiziente Zellen und ATM-defiziente Zellen zeigen ebenfalls die kernweite Antwort, die durch zusätzliche Inhibition der jeweiligen anderen Kinase vollständig unterdrückt werden konnte (Abb. 31). Durch Unterdrückung der Proteinexpression mittels RNA-Interferenz konnte ein Einfluss von DNA-PK bestätigt werden (Abb. 32). Die Lokalisation von pATM (S1981) und pDNA-PKcs (S2056) im nicht geschädigten Bereich des Chromatins steht ebenfalls im Einklang mit einer Beteiligung beider Kinasen (Abb. 33).

In direkter Nähe zu den DSBs wird nach ionisierender Bestrahlung die Phosphorylierung von H2AX ebenfalls durch ATM und DNA-PK katalysiert (Stiff et al., 2004). Dies konnte in dieser Arbeit auch für die Entstehung von  $\gamma$ H2AX in der Nähe der komplexen DNA-Schäden bestätigt werden (Abb. 36). In den meisten Experimenten konnte die Entstehung der  $\gamma$ H2AX-Foci zwar nicht durch gleichzeitige Inhibition von ATM und DNA-PK vollständig unterdrückt werden, war aber bereits reduziert. Das lässt sich dadurch erklären, dass die Aktivierung von ATM und DNA-PK nicht vollständig inhibiert werden konnte, wie mittels Western Blot Analyse gezeigt wurde (Abb. 28). Darüber hinaus entsteht durch Ionenbestrahlung eine hohe Schadensdichte, so dass eine geringe Restaktivität der Kinasen und eine geringe resultierende Phosphorylierung wahrscheinlich ausreichend sind, um einen Schadensfokus detektierbar zu machen. In Übereinstimmung damit konnte gezeigt werden, dass nach Bestrahlung mit einzelnen Stickstoffionen mit vergleichsweise geringem LET (400 keV/ $\mu$ m) die Bildung der  $\gamma$ H2AX-Foci durch ATM- und DNA-PK-Inhibition nahezu vollständig unterdrückt werden konnte und durch Herunterregulierung von ATR unbeeinflusst war (Abb. 36). Eine Verringerung der H2AX-Phosphorylierung an den DSBs war jedoch nur bei Bestrahlung mit einzelnen Stickstoffionen sichtbar, aber nicht bei mehreren Treffern in einen Punkt. Dieses Ergebnis spricht dafür, dass bei ATM- und DNA-PK-Inhibition die H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung zwar verringert ist, die  $\gamma$ H2AX-Foci aber meistens immer noch detektierbar sind wegen der hohen Schadensdichte bei Bestrahlung mit hohem LET oder bei Bestrahlung mit mehreren Ionen in einen Punkt.

Da das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal vollständig durch Inhibition von ATM und DNA-PK unterdrückt werden konnte, erschien es unwahrscheinlich, dass ATR zur kernweiten H2AX-Phosphorylierung beiträgt. Dies wurde durch Herunterregulierung der ATR-Expression bestätigt, die nicht zu einer Reduzierung von pan-nukleärem  $\gamma$ H2AX führte. Stattdessen war bei Herunterregulierung von ATR ein Anstieg der H2AX-Phosphorylierung zu verzeichnen (Abb. 35). ATR scheint also eher zur Reduzierung der kernweiten Antwort beizutragen. Allerdings müsste dieses Ergebnis noch durch weitere Versuche bestätigt werden. Chanoux et al. (2009) konnten zeigen, dass bei ATR-Defizienz die Induktion von replikativem Stress zu einer ATM- und DNA-PK-abhängigen H2AX-Phosphorylierung führt, die zur Erhaltung der genomischen Stabilität beiträgt. Es ist nicht auszuschließen, dass ATR auch in der G0/G1-Phase nach Induktion komplexer Schäden bei der Stabilisierung einzelsträngiger Bereiche beteiligt sein könnte, so dass eine Reduktion von ATR zur Erhöhung der DNA-Schäden und des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals führt. Untersuchungen in unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Marker für einzelsträngige DNA nach Schwerionenbestrahlung auch in der G1-Phase detektierbar sind (Herrlitz, 2010). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit einer möglichen Rekrutierung von ATR an komplexe DNA-Schäden in der G1-Phase. In diesem Fall wäre auch vorstellbar, dass an komplexe DNA-Schäden rekrutiertes ATR einen Beitrag zur H2AX-Phosphorylierung leistet. Da die ATR-Rekrutierung jedoch von ATM abhängig ist (Jazayeri et al., 2006), würde ein möglicher Beitrag von ATR zur H2AX-Phosphorylierung wahrscheinlich durch ATM-Inhibition unterdrückt werden.

Wie bereits in Kapitel 2.4 erwähnt, beeinflussen sich ATM und DNA-PK gegenseitig über eine Regulierung der Expression aber auch durch gegenseitige Phosphorylierung. Beispielsweise zeigen Solier et al. (2009), dass sich ATM und DNA-PK nach Induktion von Apoptose durch TRAIL-Behandlung gegenseitig phosphorylieren. Die Phosphorylierung von ATM (S1981) war dabei vollständig von DNA-PK abhängig, während ATM zur Phosphorylierung von DNA-PKs an T2609 beitrug. In den Untersuchungen der vorliegenden Arbeit wurde die Menge an pDNA-PK (S2056) nach Bestrahlung durch DNA-PK-Inhibition zwar stark verringert, durch zusätzliche ATM-Inhibition wurde diese Menge jedoch weiter reduziert (Abb. 28). Dies deutet einerseits darauf hin, dass die im Western Blot gezeigten Mengen an phosphorylierter Kinase nicht 1:1 mit der Aktivität der Kinase korrelieren müssen, sondern auch durch andere Kinasen beeinflusst sein können. Andererseits wird klar, dass die Aktivität von ATM und DNA-PK experimentell nicht vollkommen unabhängig voneinander beeinflusst werden kann und somit konkrete Aussagen über das Ausmaß der Beteiligung beider Kinasen an der H2AX-Phosphorylierung erschwert werden. Dennoch ließ sich eindeutig nachweisen, dass sowohl ATM als auch DNA-PK an der kernweiten Reaktion beteiligt sind, da sowohl in ATM-defizienten als auch in DNA-PK-defizienten Zelllinien die pan-nukleäre H2AX-Phosphorylierung ausgelöst wird. DNA-PK und ATM können sich dabei gegenseitig nicht vollständig ersetzen, da meist eine Reduktion von kernweitem  $\gamma$ H2AX verzeichnet wurde, wenn nur eine der beiden Kinasen aktiv war.

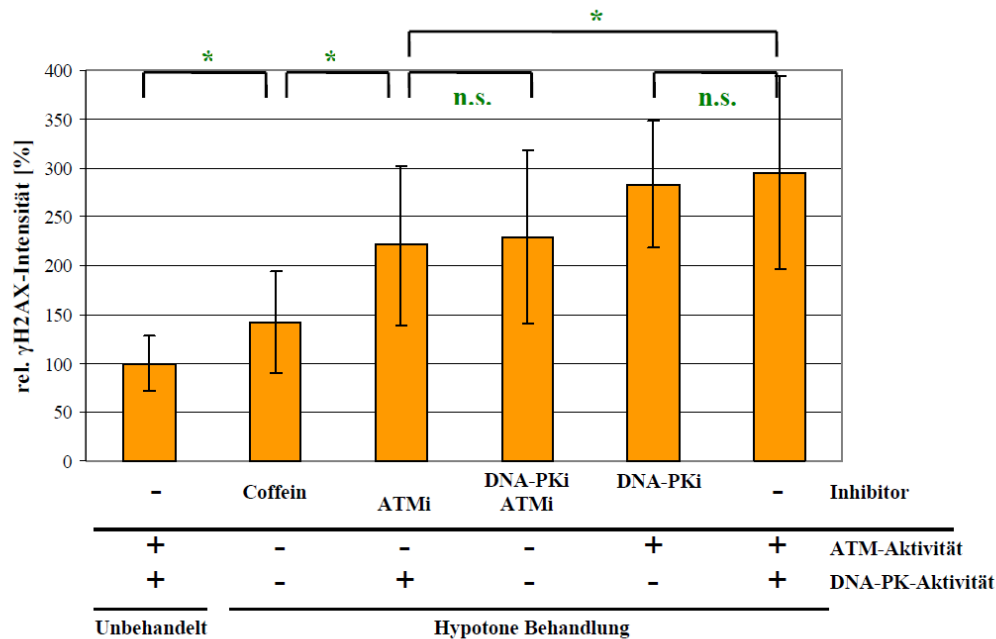
Es wird angenommen, dass die Bindung an DNA-Enden für die Aktivierung von DNA-PK verantwortlich ist, da die katalytische Untereinheit von DNA-PK (DNA-PKcs) erst am DNA-Ende zusammen mit Ku70 und Ku80 den vollständigen Enzymkomplex bildet (Meek et al., 2008). Allerdings kann DNA-PK auch ohne DNA-Schäden aktiviert werden, beispielsweise über die Acetylierung von Histonen nach Hypoxie, wobei aktiviertes DNA-PK an der Regulierung von Transkription als Antwort auf hypoxischen Stress beteiligt ist (Bouquet et al., 2011). Bakkenist und Kastan (2003) beschreiben, dass ATM durch Chromatinstrukturveränderung aktiviert werden kann. ATM kann jedoch auch über DNA-

Fragmente und Einzelstrangüberhänge bis zu einer gewissen Länge aktiviert werden (Shiotani und Zou, 2009). Es könnten also sowohl Chromatinstrukturveränderungen, als auch DNA-Enden für die Aktivierung beider Kinasen verantwortlich sein. Auch eine kernweite H2AX-Phosphorylierung kann durch verschiedene Situationen ausgelöst werden. Im Folgenden soll die Kinaseabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung in den unterschiedlichen beschriebenen Stresssituationen diskutiert werden.

ATM und DNA-PK sind bei den in der Literatur beschriebenen kernweiten Reaktionen ebenfalls hauptsächlich für die H2AX-Phosphorylierung verantwortlich. Collaco et al. (2009) zeigen nach Co-infektion von HeLa Zellen mit dem Adeno-Virus und dem Adeno-assoziierten Virus einen Anstieg von  $\gamma$ H2AX, der von DNA-PK und ATM abhängig ist. Schwartz et al. (2009) untersuchten ebenfalls die Reaktion nach Virusinfektion und beschreiben eine DNA-PK-Abhängigkeit der Phosphorylierung anderer Proteine wie RPA, SMC1 und CHK2, die Abhängigkeit der H2AX-Phosphorylierung wurde nicht untersucht. Für beide Kinasen sind jedoch die autophosphorylierten Formen nachweisbar. Nach Transfektion von DNA-Fragmenten beschreiben Quanz et al. (2009b) eine Abhängigkeit der kernweiten Reaktion von DNA-PK, wobei auch ATM phosphoryliert wird.

Die durch hypotone Behandlung ausgelöste kernweite H2AX-Phosphorylierung kann durch Verwendung des unspezifischen Inhibitors Wortmannin inhibiert werden, was ebenfalls auf eine Regulierung durch Kinasen der PIKK-Familie hindeutet (Baure et al., 2009). Bakkenist und Kastan (2003) zeigten, dass nach hypotoner Behandlung ATM aktiviert wird, was bedeuten könnte, dass ATM nach hypotoner Behandlung die kernweite Reaktion vermittelt. In unserer Arbeitsgruppe durchgeführte Arbeiten im Rahmen eines von mir betreuten Praktikums zeigten jedoch, dass das durch hypotone Lösung verursachte  $\gamma$ H2AX-Signal in Übereinstimmung mit Baure et al. (2009) zwar stark durch Koffein-Behandlung unterdrückt werden konnte. Allerdings war es nur teilweise durch ATM-Inhibition und nicht durch DNA-PK-Inhibition beeinflussbar (Abb. 48). Dies würde bedeuten, dass die Regulierung nach hypotonem Stress anders verläuft als nach Ionenbestrahlung und könnte ein Hinweis sein, dass der Auslöser für die kernweite Reaktion nach Ionenbestrahlung nicht die Induktion einer globalen Chromatinstrukturveränderung ist.

Marti et al. (2006) beschreiben nach UV-Bestrahlung neben dem starken  $\gamma$ H2AX-Signal in der S-Phase ein schwächeres in der G1-Phase, das in NER-defizienten Zellen verringert ist. Allerdings konnte dieses Signal nicht durch Wortmannin unterdrückt werden und tritt nach lokaler UV-Bestrahlung nicht im ganzen Kern, sondern nur im bestrahlten DNA-Bereich auf, was darauf hindeutet, dass es sich hier um einen anderen Mechanismus der H2AX-Phosphorylierung handelt als nach Ionenbestrahlung. In S-Phase wird zu frühen Zeitpunkten nach UV-Bestrahlung H2AX über den gesamten Zellkern von ATR phosphoryliert, allerdings kommt es auch zur Aktivierung von ATM und zu späten Zeitpunkten zur Ausbildung von DSBs und der Aktivierung von DNA-PK (Yajima et al., 2009). Bei ATR-Defizienz führt replikativer Stress zu einer massiven H2AX-Phosphorylierung durch ATM und DNA-PK, die dazu beiträgt Translokationen zu vermeiden (Chanoux et al., 2009). Von de Feraudy et al. (2010) wird beschrieben, dass die vollständige Ausbildung des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals in der S-Phase nach UV-Bestrahlung ATM, JNK (c-Jun N-terminale Kinase) und auch NER benötigt. Hier zeigen sich also klare Unterschiede zur Regulierung der kernweiten Antwort nach Ionenbestrahlung, da nach Induktion komplexer DNA-Schäden die Antwort nicht von NER abhängig ist (Abb. 12), kein Beitrag von ATR zur H2AX-Phosphorylierung nachweisbar war und die



**Abbildung 48: Kinase-Abhängigkeit von pan-nukleärem  $\gamma$ H2AX nach Behandlung mit hypotoner Lösung.** Konfluente humane Fibroblasten (AG1522) wurden eine Stunde mit Koffein, ATM-Inhibitor (ATMi, KU55933) oder DNA-PK-Inhibitor (DNA-PKi, IC86621) behandelt, anschließend mit 1:3 verdünnter PBS (entspricht 46 mM NaCl) für eine Stunde inklusive entsprechenden Inhibitoren und 30 Minuten mit isotonomem Medium mit Inhibitoren behandelt. Die Intensität des  $\gamma$ H2AX-Signals wurde gemessen. Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung; \* = signifikant mit  $p < 0.05$  nach Student's T-Test; n.s. = nicht signifikant (Praktikum Bettina Kass, Hochschule Darmstadt, 2011).

H2AX-Phosphorylierung auch in weit von den DNA-Schäden entfernten Bereichen stattfindet.

Bei der apoptotischen H2AX-Phosphorylierung scheint es sich klar um einen DNA-PK-abhängigen Prozess zu handeln. Mukherjee et al. (2006) zeigen, dass DNA-PK für die durch Behandlung mit dem Proteinkinase-Inhibitor Staurosporin ausgelöste apoptotische H2AX-Phosphorylierung notwendig ist. Auch nach Behandlung mit dem Apoptose-induzierenden Protein TRAIL, war die H2AX-Phosphorylierung durch Herunterregulierung von DNA-PK stark unterdrückt (Solier et al., 2009). Das Muster des  $\gamma$ H2AX-Signals unterscheidet sich jedoch von dem nach Schwerionenbestrahlung beobachteten  $\gamma$ H2AX-Signal, da bei Apoptose die Phosphorylierung erst am Rand des Zellkerns am Heterochromatin von Tumorzellen und normalen Epithelzellen beginnt, hier lokalisieren auch pATM (S1981) und pDNA-PK (T2609), und sich zu späteren Zeitpunkten über den gesamten Zellkern erstreckt. Die Kinaseabhängigkeit und das beschriebene Muster der H2AX-Phosphorylierung bei Apoptose bestätigen die in der vorliegenden Arbeit gezeigten Ergebnisse, dass die kernweite Antwort nach Ionenbestrahlung nicht mit Apoptose zusammenhängt (vergleiche Kapitel 5.4.1).

Bei Betrachtung der Literatur stellt sich also heraus, dass beim Auftreten von DNA-Fragmenten, sei es durch Transfektion, bei Virusinfektion oder Apoptose, eine starke DNA-PK-Aktivierung beobachtet werden kann, wobei auch ATM in diesen Fällen phosphoryliert werden kann. Nach Chromatinstrukturveränderungen hingegen scheinen eher ATM oder andere Kinasen aktiviert zu werden und nach UV-Bestrahlung sind vor allem ATR und auch NER in die kernweite Reaktion involviert. Dies deutet darauf hin, dass nach Ionenbestrahlung Chromatinstrukturveränderungen wahrscheinlich nicht der Hauptausröser für die kernweite Antwort sind, stattdessen könnten andere Faktoren wie DNA-Enden oder DNA-Fragmente bei der Induktion der kernweiten Antwort beteiligt sein.

### 5.2.4 Zellzyklusabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung

Die Untersuchungen in dieser Arbeit ergaben, dass das kernweite  $\gamma$ H2AX-Signal nach Ionenbestrahlung sowohl in der G1- als auch in der G2-Phase des Zellzyklus auftritt, in der G1-Phase jedoch verstärkt ist (Abb. 20). Dies war zunächst nicht erwartet, da sowohl die Menge der induzierten DNA-Schäden in der G2-Phase durch den höheren DNA-Gehalt zunehmen sollte, aber auch die Menge an H2AX entsprechend steigen sollte. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass das Verhältnis von DNA- zum H2AX-Gehalt in der G1-Phase anders ist als in der G2-Phase. Es ist nicht anzunehmen, dass der Unterschied in beiden Zellzyklusphasen über eine unterschiedliche Regulierung von ATM und DNA-PK zustande kommt. Denn NHEJ ist sowohl in der G1-, als auch der G2-Phase des Zellzyklus der Hauptreparaturweg für DSBs, DNA-PK wird also in beiden Zellzyklusphasen benötigt, und ATM ist gerade in der G2-Phase an der Reparatur von DSBs im Heterochromatin über HR beteiligt (Beucher et al., 2009). Es könnte aber auch eine schnellere Rückbildung des auslösenden Signals in der G2-Phase zu einem geringeren  $\gamma$ H2AX-Signal in G2-Zellen führen. Die Rückbildung könnte beispielsweise mit der Prozessierung von DNA-Enden und -Fragmenten zusammenhängen, die in der G2-Phase begünstigt sein könnte. CtIP wird beispielsweise in der S- und G2-Phase stärker exprimiert (Yu und Baer, 2000) und CDK-abhängig phosphoryliert (zur Übersicht You und Bailis (2010)). Normalerweise findet Resektion im Rahmen der HR in der S- und G2-Phase statt. Jedoch scheint eine Prozessierung von DNA-Enden durch CtIP und MRN auch in der G1-Phase möglich zu sein (Yun und Hiom, 2009; Quennet et al., 2011). Tatsächlich wird CtIP auch in der G1-Phase nach Schwerionenbestrahlung an DNA-Schäden rekrutiert (Herrlitz, 2010), allerdings konnte ein Einfluss von CtIP auf die kernweite Reaktion in dieser Arbeit nicht gezeigt werden, während ein Einfluss von Mre11 nicht ausgeschlossen werden konnte (vergleiche Kapitel 5.4.3). Auch in anderen Stresssituationen wurde gezeigt, dass die kernweite H2AX-Phosphorylierung nicht auf eine Zellzyklusphase beschränkt ist. So ist nach Transfektion von DNA-Fragmenten das Signal ebenfalls in allen Zellzyklusphasen vorhanden (Quanz et al., 2009b). Nach hypotoner Behandlung findet eine kernweite Reaktion in proliferierenden und konfluenten Zellen statt (Baure et al., 2009).

In unbestrahlten Zellen war das  $\gamma$ H2AX-Signal in der G2-Phase höher als in der G1-Phase (Abb. 20). Die gemessene  $\gamma$ H2AX-Intensität in unbestrahlten Zellen ist wahrscheinlich stark beeinflusst durch das  $\gamma$ H2AX-Signal an endogen entstandenen DSBs. Denn die Einstellungen für die Aufnahmen am Fluoreszenzmikroskop wurden so getroffen, dass die Ionen-induzierten Foci in Sättigung waren. Die endogen induzierten  $\gamma$ H2AX-Foci weisen jedoch eine geringere Intensität auf, sind also mit den gewählten Einstellungen nicht in Sättigung und gehen in die Auswertung mit ein. Konfluente AG1522 Zellen besitzen eine sehr geringe Anzahl an Kontrollfoci, so dass sie die Auswertung des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals nicht stark beeinflussen. In dieser Arbeit wurden 0,8  $\gamma$ H2AX-Foci/Zellkern in unbestrahlten Zellen gezählt (vergleiche Kapitel 4.3). In der S-Phase wird beim Zusammenbruch von Replikationsgabeln H2AX ATR-abhängig phosphoryliert (Ward und Chen, 2001). Da eine erhöhte Expression von CENP-F in der S-Phase beginnt (Rattner et al., 1993), kann nicht ausgeschlossen werden, dass in der Auswertung auch Zellen vor allem in der späten S-Phase mit höherem  $\gamma$ H2AX-Signal enthalten sind. Daher ist ein erhöhtes  $\gamma$ H2AX-Signal in unbestrahlten CENP-F-positiven Zellen zu erwarten. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass in den Versuchen der vorliegenden

Arbeit die Anzahl an untersuchten G2-Zellen sehr gering war und der beobachtete Wert für  $\gamma$ H2AX zufällig über dem der G1-Zellen liegen könnte. Die erhöhte Menge  $\gamma$ H2AX in unbestrahlten G2-Zellen ist jedoch in Übereinstimmung mit von Ichijima et al. (2005) beschriebenen Ergebnissen für nicht bestrahlte synchronisierte HeLa Zellen, in denen sich ein maximales  $\gamma$ H2AX-Signal in der späten S-Phase und in der G2-Phase zeigte.

### **5.2.5 Abhängigkeit der kernweiten Antwort vom LET**

In der vorliegenden Arbeit wurde die Quantifizierung der kernweiten Antwort nach Bestrahlung mit verschiedenen Ionen bei verschiedenen Strahlzeiten mit jeweils unterschiedlichen Einstellungen vorgenommen, um eine Sättigung der Intensität der  $\gamma$ H2AX-Foci zu erreichen (vergleiche Kapitel 4.1.5). Die Einstellungen der Aufnahmen wurden also bei jedem Experiment an das  $\gamma$ H2AX-Signal angepasst. Daher sind die erhaltenen absoluten Werte aus verschiedenen Experimenten nicht direkt miteinander vergleichbar. Es lässt sich anhand dieser Daten also keine Aussage darüber treffen, ob bei Kohlenstoffbestrahlung die gleiche Menge an H2AX phosphoryliert wird wie nach gleicher Dosis Goldbestrahlung, ob die Antwort also LET-abhängig ist. Für eine eindeutige Aussage wäre eine gleichzeitige Untersuchung nach Bestrahlung mit Ionen unterschiedlichen LETs nötig. Dies war durch die Gegebenheiten an der Beschleunigeranlage jedoch nicht möglich. Es wurde aber durch Normierung der Dosis-Effekt-Kurven auf eine Höhe gezeigt, dass sich für den dosisabhängigen Signalanstieg bei Bestrahlung mit unterschiedlichen Ionen ein ähnlicher Kurvenverlauf ergibt (Abb. 22 F). Dieses Ergebnis könnte ein Hinweis darauf sein, dass der Signalanstieg unabhängig vom LET ist. Allerdings müsste für eine eindeutige Aussage ein größerer Dosisbereich untersucht werden vor allem für die Ionen mit niedrigem LET, um zu zeigen, dass sie dem in (Abb. 22 F) angedeuteten Kurvenverlauf folgen. Eine LET-Abhängigkeit kann also anhand dieser Daten nicht ausgeschlossen werden.

In dieser Arbeit wurde aber auch gezeigt, dass bei 10 Gy Kohlenstoffbestrahlung deutlich mehr pDNA-PKcs (S2056) entsteht als nach 10 Gy Röntgenbestrahlung, also eine offensichtliche LET-Abhängigkeit der DNA-PK-Aktivierung (Abb. 34 A). Bei dicht ionisierender Bestrahlung entstehen bei gleicher Dosis mehr DSBs, als bei locker ionisierender Strahlung, da durch die lokal begrenzte Dosisdeposition mehr ESBs in räumlicher Nähe zueinander entstehen, die zusätzliche DSBs bilden können. Dies wird bestätigt durch Messungen von DSBs mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese nach Bestrahlung mit unterschiedlicher Strahlenqualität (Stenerlöv et al., 1994). Darüber hinaus lässt sich durch Berücksichtigung der zusätzlich durch ESBs im Abstand von unter 25 bp entstehenden DSBs im Local-Effect-Modell (LEM) das Überleben von Zellen nach ionisierender Bestrahlung mit einer höheren Genauigkeit beschreiben (Elsässer und Scholz, 2007). Psonka-Antonczyk et al. (2009) untersuchten die Fragmentlängen nach Schwerionenbestrahlung von Plasmid-DNA mittels Rasterkraftmikroskopie, wobei die Ergebnisse in guter Übereinstimmung mit den Modellrechnungen mit Hilfe dieser Version des LEM sind (Elsässer et al., 2008). Da DNA-PK durch Bindung an DNA-Enden aktiviert wird (Meek et al., 2008), liegt es nahe, dass die Menge der DSBs einen Einfluss auf die DNA-PK-Aktivierung hat. Bestrahlung mit hohem LET führt auch zur Bildung von kürzeren DNA-Fragmenten (Psonka-Antonczyk et al., 2009; Elsässer et al., 2008), die möglicherweise ebenfalls durch Diffusion durch den Zellkern zu einer kernweiten DNA-PK-Aktivität beitragen könnten (vergleiche Kapitel 5.4.3). Dieses Ergebnis spricht also eher für eine mögliche LET-Abhängigkeit

der kernweiten Antwort. Die Fragestellung konnte jedoch innerhalb dieser Arbeit nicht umfassend beantwortet werden.

Diese Untersuchungen werfen die Frage auf, ob ATM ebenfalls LET-abhängig aktiviert wird. ATM kann wie DNA-PK durch DNA-Enden aktiviert, so zeigten Shiotani und Zou (2009), dass ATM *in vitro* selbst von nur 20 bp langen doppelsträngigen DNA-Fragmenten aktiviert werden kann. Daher wäre vorstellbar, dass auch für ATM ein LET-Effekt vorliegt. Allerdings war die Menge pATM (S1981) in der Western Blot Analyse schon bei 10 Gy Röntgenbestrahlung gesättigt und konnte bei Kohlenstoffbestrahlung mit ebenfalls 10 Gy und höheren Dosen nicht weiter erhöht werden (Abb. 34 A). Möglicherweise ist ein Dosis- und LET-Effekt für ATM nur bei niedrigeren Dosen feststellbar oder aber ATM wird immer vollständig aktiviert. Untersuchungen in dieser Arbeit ergaben, dass bei Bestrahlung mit einzelnen Kohlenstoffionen pATM (S1981) auch im nicht beschädigten Bereich des Zellkerns nachweisbar ist und die Menge pATM (S1981) im unbeschädigten Bereich mit zunehmender Dosis (bis ungefähr 4 Gy) weiter ansteigt (Abb. 34 B). Dieses Ergebnis deutet auf eine Dosisabhängigkeit von pATM (S1981) bei niedrigeren Dosen hin.

Für die kernweite H2AX-Phosphorylierung könnte eine Sättigung der ATM-Aktivierung bedeuten, dass nach Bestrahlung mit höheren Dosen DNA-PK eine zunehmend größere Rolle spielen könnte als ATM. Dadurch ließe sich der Kurvenverlauf der erhaltenen Dosis-Effekt-Kurven erklären (Abb. 22), die bei niedrigen Dosen eine größere Steigung aufweisen und bei höheren Dosen eine geringere Steigung. Bei niedrigen Dosen könnten sowohl ATM als auch DNA-PK zunehmend aktiviert werden, wodurch sich ein schneller Signalanstieg pro Doseinheit ergeben könnte. Bei höheren Dosen wäre ATM vollständig aktiviert und nur noch die Menge an aktiviertem DNA-PK würde weiter zunehmen, so dass der Signalanstieg pro Doseinheit verlangsamt werden könnte. Möglicherweise ließen sich auch in der Literatur beschriebene unterschiedliche Beobachtungen dadurch erklären. So beschreiben beispielsweise Collaco et al. (2009) nach Virusinfektion eine Abhängigkeit der kernweiten Reaktion von DNA-PK und ATM, während Schwartz et al. (2009) eine Abhängigkeit von DNA-PK aufzeigen. Es ist vorstellbar, dass beide Kinasen zwar nach Virusinfektion aktiviert werden, die DNA-PK-Aktivität jedoch gegenüber der ATM-Aktivität dominiert.

Es konnte also eine LET-Abhängigkeit der DNA-PK-Aktivierung festgestellt werden, um jedoch eine Dosis- und LET-Abhängigkeit der ATM-Aktivierung zu überprüfen, wären weitere Experimente im Dosisbereich unter 10 Gy nötig. Eine LET-Abhängigkeit der kernweiten Phosphorylierung von H2AX nach Ionenbestrahlung konnte nicht eindeutig gezeigt werden, diese ist aber aufgrund der gezeigten LET-abhängigen DNA-PK-Aktivierung naheliegend.

## 5.3 Folgen der kernweiten Antwort für andere Reparaturproteine

### 5.3.1 Kernweite Phosphorylierung weiterer Reparaturproteine

Es stellte sich die Frage, ob auch andere Proteine als H2AX von der kernweiten Aktivität von ATM und DNA-PK betroffen sind. Es wäre vorstellbar, dass ATM und DNA-PK bei Diffusion durch den Zellkern in aktivem Zustand nicht nur H2AX, sondern auch unspezifisch weitere Zielproteine phosphorylieren. In diesem Fall müssten auch die phosphorylierten Formen weiterer Reparaturproteine im unbeschädigten Bereich des Chromatins nachweisbar sein. Nach Ionenbestrahlung konnte in dieser Arbeit allerdings nur ein schwaches pNBS1 (S343) und ein minimales pRPA (S4/S8) Signal

im nicht beschädigten Bereich des Zellkerns detektiert werden (Abb. 41). Auch Chk2 wird in den untersuchten Zellen an T68 phosphoryliert und ist über den gesamten Zellkern verteilt, allerdings ist die Phosphorylierung nicht gesättigt und für p-p53 (S15) wurde eine Stunde nach Bestrahlung kein Fluoreszenzsignal detektiert (nicht gezeigt).

Dies ist ein klarer Unterschied zu den in der Literatur beschriebenen kernweiten Stressantworten. Quanz et al. (2009b) zeigen nach Transfektion von DNA-Fragmenten eine massive Phosphorylierung von Chk2 (T68), Chk1 (S345), RPA (S4/S8), ATM (S1981), NBS1 (S343) und p53 (S15), die in den Aufnahmen vollständig gesättigt erscheinen. Allerdings wurden die DNA-Fragmente offenbar im Überschuss in die Zellen transfiziert, wie der verzögerte Rückgang der H2AX-Phosphorylierung vermuten lässt (vergleiche Kapitel 5.2.2), so dass die Kinasen in diesem Fall deutlich stärker aktiviert sein könnten als nach Ionenbestrahlung. Es wird jedoch auch gezeigt, dass eine größere Population an  $\gamma$ H2AX-positiven Zellen entsteht als an p53 (S15) oder pChk2 (T68) positiven Zellen, und dass nicht alle  $\gamma$ H2AX-positiven Zellen auch pRPA (S4/S8) positiv sind, was vermuten lässt, dass die H2AX-Phosphorylierung stärker ist oder eher einsetzt als die Phosphorylierung weiterer Proteine. Schwartz et al. (2009) zeigen bei Koinfektion von Adenovirus und Adeno-assoziiertem Virus ein pan-nukleäres Signal von  $\gamma$ H2AX, pATM (S1981) und pSMC1 (S957) durch Immunfluoreszenzfärbung und mittels Western Blot Analyse die Phosphorylierung von Chk1 (S317, S345), Chk2 (T68) und RPA (S4/8, S33, T21).

Die kernweite Antwort nach Ionenbestrahlung unterscheidet sich also ganz klar von anderen beschriebenen kernweiten Stressantworten, da die kernweite Phosphorylierung anderer Proteine nach Ionenbestrahlung sehr schwach ist und auch das  $\gamma$ H2AX-Signal nicht gesättigt ist. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Kinasen nach Ionenbestrahlung weniger stark aktiviert sind als nach Virusinfektion oder Transfektion von DNA-Fragmenten. Die Phosphorylierung von H2AX kann am DNA-Schaden über positive Rückkopplung durch MDC1 weiter verstärkt werden (Lou et al., 2006). Es wurde aber auch vorgeschlagen, dass die Bindung von MDC1  $\gamma$ H2AX vor Dephosphorylierung schützt (Jungmichel und Stucki, 2010). Damit in Übereinstimmung sind die Untersuchungen dieser Arbeit, die zeigen, dass MDC1 auch kernweit bindet und zu einer Verstärkung der H2AX-Phosphorylierung führt (vergleiche Kapitel 5.3.2). Es wäre daher vorstellbar, dass die Stärke der initialen Phosphorylierung für H2AX und andere Reparaturfaktoren ähnlich sein könnte, das  $\gamma$ H2AX-Signal jedoch durch die MDC1-vermittelte positive Rückkopplung verstärkt oder durch MDC1 vor Dephosphorylierung geschützt wird und deshalb besser detektierbar ist.

### **5.3.2 Einfluss von pan-nukleärem $\gamma$ H2AX auf die MDC1- und 53BP1-Bindung**

Es wurde beschrieben, dass bei der Induktion von kernweisem  $\gamma$ H2AX durch DNA-Fragmente die DNA-Reparatur bei einer darauf folgenden Bestrahlung inhibiert ist (Quanz et al., 2009a,b). Es stellte sich die Frage, ob bei Ionenbestrahlung ebenfalls die DNA-Reparatur durch pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX verringert ist und die kernweite Antwort somit zur biologischen Wirksamkeit von Ionenstrahlen beitragen könnte. Da  $\gamma$ H2AX eine Bindungsplattform für andere Reparaturproteine ist, wäre es vorstellbar, dass andere Reparaturfaktoren an kernweites  $\gamma$ H2AX binden und die Menge an ungebundenen Reparaturproteinen stark erschöpft wird, so dass die DNA-Reparatur verringert werden würde. Da die Bindung von MDC1 und 53BP1 an das Chromatin von H2AX beeinflusst wird (Celeste et al., 2002; Fernandez-Capetillo et al., 2002; Stucki et al., 2005), wurde der Einfluss von pan-nukleärem



$\gamma$ H2AX auf diese beiden Proteine untersucht. Da die Signale dieser beiden Proteine bereits in unbestrahlten Zellen, in denen das ungebundene Protein über den gesamten Zellkern verteilt ist, sehr schwach sind, konnte Extraktion zur Untersuchung einer möglichen kernweiten Bindung nicht verwendet werden. Stattdessen wurde eine sequentielle Bestrahlung von Zellen mit Ionen- und mit Röntgenstrahlen durchgeführt, um eine mögliche durch pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX verringerte Bindung an den bei der zweiten Bestrahlung entstandenen DNA-Schaden zu überprüfen.

Die Untersuchungen der 53BP1-Akkumulation nach sequentieller Bestrahlung ergaben, dass 53BP1 keine sekundären Ionen- oder Röntgenfoci bildet, wenn zuvor eine erste Ionenbestrahlung stattgefunden hat (Abb. 42 und Abb. 44). Dieses Ergebnis ist im Einklang mit den Untersuchungen von Greubel et al. (2008), die beschreiben, dass bei zweimaliger Bestrahlung mit Sauerstoffionen 53BP1 stark am ersten, früheren DNA-Schaden gebunden ist. Die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit zeigen außerdem, dass auch bei einer ersten Bestrahlung mit Röntgenstrahlen, bei der keine kernweite H2AX-Phosphorylierung induziert wurde, und anschließender Bestrahlung mit Ionen 53BP1 stärker an den ersten DNA-Schaden gebunden ist (Abb. 45), obwohl der zweite Ionen-induzierte DNA-Schaden viel massiver ist. Daraus lässt sich schließen, dass 53BP1 fest an den ersten DNA-Schaden bindet unabhängig von der kernweiten Antwort und relativ langsam ausgetauscht wird. Dieses Ergebnis wird bestätigt durch in unserer Arbeitsgruppe durchgeführte FRAP-Untersuchungen (FRAP, *fluorescence recovery after photobleaching*), die zeigen, dass die Austauschrate von 53BP1 am DNA-Schaden sehr gering ist und sich für 53BP1 nach Ionenbestrahlung im nicht getroffenen Bereich kein unterschiedliches Bindungsverhalten ergibt (Tobias, 2011).

Die Untersuchungen von MDC1 hingegen zeigen, dass es mit großer Wahrscheinlichkeit auch an kernweites  $\gamma$ H2AX bindet. MDC1 kann zwar nach Induktion der kernweiten Antwort auch sekundäre Ionen-Foci ausbilden (Abb. 43), teilweise sind die sekundären Ionen-Foci jedoch abgeschwächt. Darüber hinaus ist die Entstehung von sekundären Röntgen-Foci durch MDC1 nach einer ersten Ionenbestrahlung stark verringert (Abb. 44). Wurde zuerst mit Röntgenstrahlen bestrahlt, also ohne Induktion einer starken kernweiten Antwort, und danach mit Ionen, ist das MDC1-Signal an beiden Schadensarten eher schwach (Abb. 45). Dies könnte bedeuten, dass nach Induktion einer hohen Anzahl an DNA-Schäden, die Menge MDC1 nicht ausreicht, um an allen beschädigten Stellen ein intensives Signal hervorzurufen oder dass bereits 20 Minuten nach der zweiten Bestrahlung mit Ionen MDC1 teilweise auch pan-nukleär bindet. Auch bei schräger, einmaliger Ionenbestrahlung war das MDC1-Signal generell an der Ionenspur eher schwach (Abb. 46 c und d). Durch Inhibition von ATM und DNA-PK, also bei Unterdrückung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung, war das MDC1-Signal an der Ionenspur jedoch sehr intensiv (Abb. 46 e). Desweiteren kann MDC1 auch an Kontrollfoci, peripheren Ionentreffern und Röntgenfoci ein intensives Signal ausbilden, also immer dann, wenn keine starke kernweite Phosphorylierung von H2AX induziert wurde. Das lässt also darauf schließen, dass MDC1 auch im gesamten Zellkern an  $\gamma$ H2AX bindet. Dies wurde wiederum durch FRAP-Experimente eindeutig unterstützt (Tobias, 2011), durch die nachgewiesen werden konnte, dass MDC1 nach Ionenbestrahlung im nicht beschädigten Bereich des Zellkerns ein stärkeres Bindungsverhalten zeigt als in unbestrahlten Zellen.

Soutoglou und Misteli (2008) zeigen, dass durch Akkumulation von Reparaturfaktoren wie MDC1, NBS1, Mre11 oder ATM an unbeschädigter DNA eine H2AX-Phosphorylierung ausgelöst werden kann und dadurch auch weitere Reparaturproteine rekrutiert werden. Es stellte sich daher die Fra-

ge, ob MDC1 möglicherweise *upstream* von der H2AX-Phosphorylierung an unbeschädigte DNA bindet, da beispielsweise das Chromatin dort nach Ionenbestrahlung modifiziert wurde, und dadurch die kernweite H2AX-Phosphorylierung auslöst oder ob MDC1 erst *downstream* von  $\gamma$ H2AX bindet. Diese Frage sollte durch Untersuchung von MDC1-defizienten Zellen geklärt werden. Es wurde gezeigt, dass auch MDC1-/- Zellen ein kernweites  $\gamma$ H2AX-Signal ausbilden (Abb. 47). Das bedeutet, dass die Bindung von MDC1 keine Voraussetzung für die kernweite Antwort ist. In Übereinstimmung mit Untersuchungen von Lou et al. (2006) konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden, dass MDC1 die H2AX-Phosphorylierung sowohl am DNA-Schaden als auch im pan-nukleären Bereich verstärkt. Es stellte sich also heraus, dass MDC1 kernweit nach Ionenbestrahlung bindet, für andere Reparaturfaktoren sind jedoch keine Hinweise auf eine kernweite Bindung vorhanden. Am DNA-Schaden führt die Bindung von MDC1 jedoch zur Rekrutierung von 53BP1 (Stewart et al., 2003). Möglicherweise wird die für die 53BP1-Bindung nötige Ubiquitinierung (Stewart et al., 2009) pan-nukleär nicht initiiert.

Nach der Transfektion von DNA-Fragmenten durch Quanz et al. (2009b) wurde die Bindung von MDC1 nicht untersucht, die Autoren geben jedoch an, dass die Proteine, die stark phosphoryliert werden, bei anschließender Bestrahlung keine Foci mehr bilden. Dies könnte allerdings damit zusammenhängen, dass durch zusätzliche Bestrahlung keine zusätzliche Phosphorylierung der Proteine entstehen könnte, da sowohl für  $\gamma$ H2AX als auch für die untersuchten Phosphoproteine ein starkes Signal gezeigt wurde, das nahezu gesättigt erscheint. Die Autoren zeigen weiter, dass auch die Bildung von 53BP1-Foci nach dieser Behandlung bei zusätzlicher Bestrahlung unterdrückt ist (Quanz et al., 2009a).

In der vorliegenden Arbeit wurde außerdem der Einfluss von MDC1 auf die Kinaseabhängigkeit der kernweiten H2AX-Phosphorylierung überprüft, da vor allem zwischen ATM und MDC1 eine gegenseitige Abhängigkeit erwartet wird (Lou et al., 2006). Es zeigte sich, dass MDC1 sowohl die ATM- als auch die DNA-PK-abhängige Phosphorylierung von H2AX verstärkt. Dieses Ergebnis wird unterstützt durch Untersuchungen von Soutoglou und Misteli (2008), die zeigen, dass durch eine Akkumulation von MDC1 an unbeschädigter DNA, eine H2AX-Phosphorylierung ausgelöst wird, die sowohl ATM- als auch DNA-PK-abhängig ist. Das würde bedeuten, dass gebundenes MDC1 beide Kinasen in Abwesenheit von DNA-Brüchen beeinflussen kann. Entsprechend den Untersuchungen von Soutoglou und Misteli (2008) sollte die MDC1-Bindung eine NBS1- und Mre11-Bindung zur Folge haben. Diese würden wiederum zu einer 53BP1-Bindung führen. Da nach Ionenbestrahlung jedoch keine kernweite Bindung von 53BP1 nachweisbar war, ist eine kernweite Bindung von NBS1 und Mre11 wahrscheinlich auch nur in sehr geringem Umfang zu erwarten. Auch die phosphorylierten Formen der beiden Proteine waren nur in minimalen Mengen im unbeschädigten Bereich des Chromatins lokalisiert (Abb. 41 und Abb. 13).

Zusammenfassend zeigen die Untersuchungen in dieser Arbeit, dass MDC1 auch kernweit bindet und die Phosphorylierung von H2AX durch ATM und DNA-PK sowohl am DNA-Schaden, als auch kernweit verstärkt. Durch die kernweite Bindung von MDC1 wird die Akkumulation an den DNA-Schäden verringert. Obwohl MDC1 die Rekrutierung von 53BP1 am DNA-Schaden vermittelt (Stewart et al., 2003), kommt es nicht zu einer kernweiten Bindung von 53BP1. Stattdessen ist die Menge an ungebundenem 53BP1 durch eine feste Bindung an den ersten DNA-Schaden reduziert. Eine starke Lokalisierung anderer Reparaturfaktoren im unbeschädigten Bereich konnte

nicht festgestellt werden.  $\gamma$ H2AX ist an den Foci auch bei einer zweiten Bestrahlung stärker als im nicht beschädigten Bereich des Chromatins. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX keine generelle Inhibierung der DNA-Reparatur bewirkt und die kernweite Antwort daher wahrscheinlich keinen großen Beitrag zur biologischen Wirksamkeit von Ionenstrahlen leistet.

## 5.4 Mögliche Auslöser für die kernweite Phosphorylierung von H2AX

### 5.4.1 Apoptose und Seneszenz als Auslöser für die kernweite H2AX-Phosphorylierung

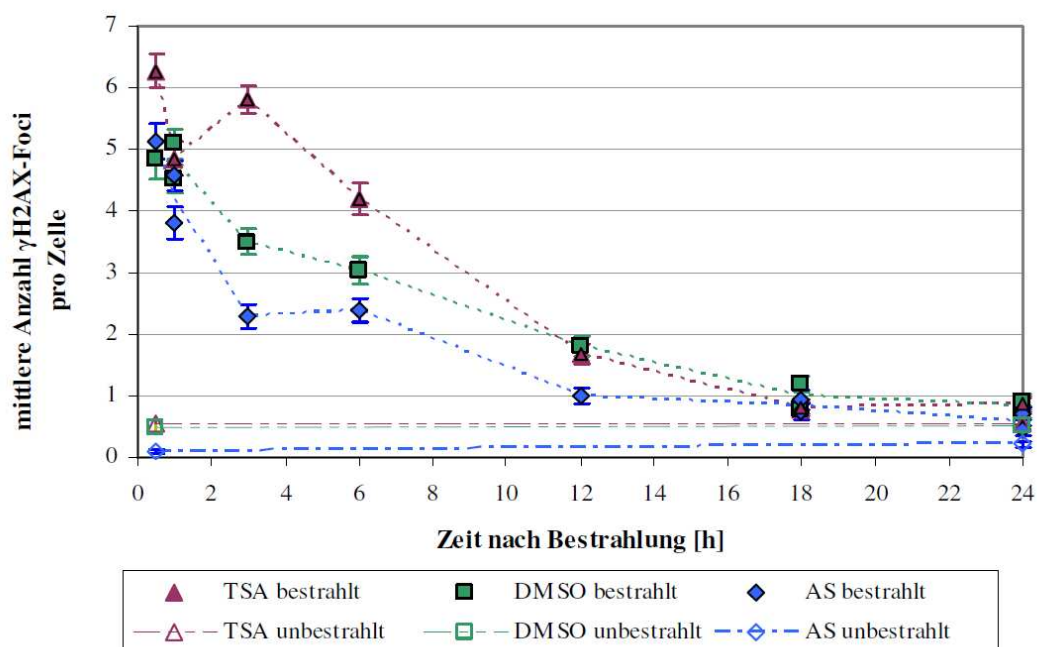
Eine starke kernweite H2AX-Phosphorylierung könnte ein Anzeichen für Apoptose sein, da die apoptotische DNA-Fragmentierung von der Phosphorylierung von H2AX an S139 begleitet wird (Rogakou et al., 2000). Durch Annexin-Färbung konnte jedoch gezeigt werden, dass trotz der massiven Schädigung der DNA durch Ionenbestrahlung das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal in humanen Fibroblasten nicht mit der Induktion von Apoptose zusammenhängt, auch wenn die Zellen mit sehr schweren Ionen wie Goldionen bestrahlt wurden (Abb. 15). Bis 24 Stunden nach Bestrahlung ist keine Färbung durch Annexin detektierbar und die Zellkerne zeigen ebenfalls keine morphologischen Anzeichen von Apoptose wie Kondensierung der DNA oder die Bildung von Apoptosekörpern. Auch der zeitliche Verlauf der kernweiten Reaktion spricht gegen Apoptose, da das Signal nur kurzzeitig vorhanden ist und dann wieder zurückgebildet wird. Das  $\gamma$ H2AX-Signal folgt nicht dem von Solier und Pommier (2009) beschriebenen apoptotischen Muster, das in 3 Phasen unterteilt werden kann, wobei ein ringförmiges Signal dem kernweiten Signal vorausgeht, welches anschließend in Apoptosekörper abgeschnürt wird. Dieses Ergebnis wird bestätigt durch verschiedene Publikationen, die ebenfalls kernweite  $\gamma$ H2AX-Signale zeigen, die nicht mit Apoptose verbunden sind. So entwickeln Zellen nach Transfektion von DNA-Fragmenten ein pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX-Signal, zeigen jedoch im TUNEL-Assay keine positiven Signale (Quanz et al., 2009b). Nach einstündiger Behandlung mit hypotoner Lösung wird ein kernweites  $\gamma$ H2AX-Signal induziert, wobei das Überleben dadurch nicht beeinträchtigt ist (Baure et al., 2009). Diese Ergebnisse bestätigen also, dass die Induktion einer kernweiten H2AX-Phosphorylierung nicht zwangsläufig mit dem Einleiten des programmierten Zelltodes im Zusammenhang steht.

Nach Ionenbestrahlung verlieren viele der bestrahlten Zellen ihre Teilungsfähigkeit, so konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass nach 1,5 Gy Neonbestrahlung nur noch ca. 10 % der Zellen koloniebildungsfähig sind (Abb. 29). Doch wie zuvor diskutiert, gehen die Zellen selbst nach Goldionenbestrahlung innerhalb von 24 Stunden nicht in Apoptose. Stattdessen werden die Zellen mit großer Wahrscheinlichkeit bei anhaltender Beschädigung der DNA seneszent. Pospelova et al. (2009) zeigen, dass in seneszenten Zellen bei Abwesenheit von DNA-Schäden  $\gamma$ H2AX gebildet wird. Die kernweite H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung könnte daher mit dem Einleiten von Seneszenz zusammenhängen. Allerdings beschreiben Pospelova et al. (2009) die Entstehung von  $\gamma$ H2AX-Foci und keinem kernweiten Signal in seneszenten Zellen. Desweiteren spricht auch hier die Zeitabhängigkeit der kernweiten Antwort klar gegen einen Zusammenhang mit Seneszenz, da kernweites  $\gamma$ H2AX am stärksten innerhalb weniger Stunden nach Bestrahlung in den Zellen vorhanden ist und dann wieder zurückgebildet wird.

### 5.4.2 Mögliche Induktion der kernweiten Antwort durch Chromatinstrukturveränderung

Untersuchungen von Bakkenist und Kastan (2003) beschreiben, dass Chromatinstrukturveränderungen ATM aktivieren. Diese können ebenfalls eine kernweite H2AX-Phosphorylierung auslösen (Baure et al., 2009). Da die Chromatinstruktur als Antwort auf DNA-Schäden über Acetylierung beeinflusst werden kann (Averbeck und Durante, 2011), wurde in dieser Arbeit ein Zusammenhang zwischen Acetylierung und der kernweiten Antwort durch Verwendung von Histonacetyltransferase- und Histondeacetylase-Inhibitoren untersucht.

Es war jedoch kein Einfluss von Acetylierung auf das Auslösen der kernweiten Antwort nachweisbar. Die Induktion einer Hyperacetylierung durch TSA-Behandlung, also einer Dekondensierung des Chromatins, löste die kernweite Antwort in unbestrahlten Zellen nicht aus. Auch die Inhibierung von Acetylierung konnte das Auslösen der kernweiten Antwort nach Ionenbestrahlung nicht verhindern. Allerdings war durch Hyperacetylierung das pan-nukleäre  $\gamma$ H2AX-Signal nach Ionenbestrahlung verstärkt (Abb. 37). Es ist jedoch nicht klar, ob dieser Effekt durch eine Hyperacetylierung der Histone und eine damit veränderte Chromatinstruktur zustande kommt oder über eine bessere Aktivierung der Kinasen durch direkte Acetylierung. Es ist beschrieben, dass ATM über direkte Acetylierung aktiviert wird (Sun et al., 2007), während DNA-PK durch acetylierte Histone bei Hypoxie aktiviert werden kann (Bouquet et al., 2011). Während einer von mir betreuten Bachelor Arbeit (Kass, 2011) konnte allerdings kein eindeutiger Einfluss von Acetylierung auf die Menge der aktivierten Kinasen nach Röntgenbestrahlung nachgewiesen werden. Acetylierung scheint jedoch einen Einfluss auch auf die H2AX-Phosphorylierung an den DNA-Schäden und damit auf die Detektierbarkeit der  $\gamma$ H2AX-Foci zu haben (Abb. 49). Dies könnte im Zusammenhang mit einer durch Hyperacetylierung



**Abbildung 49: Einfluss von Acetylierung auf die Anzahl detektierter  $\gamma$ H2AX-Foci.** Konfluente humane Fibroblasten (AG1522) wurden eine Stunde vor Bestrahlung bis zur Fixierung mit DMSO (0,2% v/v), TSA (0,3  $\mu$ M, = HDAC-Inhibitor) oder Anacardsäure (AS, 30  $\mu$ M, = HAT-Inhibitor) behandelt und mit  $3 \cdot 10^6$  Kohlenstoffionen (170 keV/ $\mu$ m) senkrecht bestrahlt. Die Zellen wurden zu entsprechenden Zeitpunkten nach Bestrahlung fixiert,  $\gamma$ H2AX gefärbt und die Anzahl der  $\gamma$ H2AX-Foci mittels automatischer Software-Analyse mit einer modifizierten Version von Image Pro Plus bestimmt. Standardabweichungen sind als Fehlerbalken dargestellt (Kass, 2011).

verbesserten Zugänglichkeit von H2AX für ATM und DNA-PK stehen, so dass die Chromatinstruktur die Phosphorylierung von H2AX begünstigen oder verringern kann. Dies wird unterstützt durch Untersuchungen von Park et al. (2003), die zeigen, dass Acetylierung von Histon zu einer stärkeren H2AX-Phosphorylierung durch DNA-PK führt. Es wurde in dieser Arbeit jedoch kein Hinweis darauf gefunden, dass acetylierungsabhängige Veränderungen des Chromatins die kernweite H2AX-Phosphorylierung auslösen. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass kernweite Veränderungen des Chromatins nach Ionenbestrahlung unabhängig von Acetylierung ausgelöst werden könnten, beispielsweise durch Chromatin-Remodeling-Komplexe. Dies könnte durch Unterdrückung der Expression der verantwortlichen Proteine untersucht werden, falls Hinweise auf eine Beteiligung dieser Komplexe bestehen. Es wurden jedoch in unserer Arbeitsgruppe keine reproduzierbaren Hinweise auf eine globale Chromatinveränderung nach Ionenbestrahlung im Zeitraum von einer Stunde nach Bestrahlung mittels Western Blot Analyse oder MNase Assay gefunden (Knoop (2009) und persönliche Mitteilung Dr. Nicole Averbeck), wenngleich eine lokale Dekondensierung des Chromatins am Schadensort erwiesen ist (Jakob et al., 2011). Darüber hinaus scheinen keine größeren Umlagerungsprozesse nach Ionenbestrahlung im Chromatin stattzufinden (Jakob et al., 2005). Gegen einen Zusammenhang der kernweiten Antwort nach Ionenbestrahlung mit einer globalen Veränderung der Chromatinstruktur spricht auch die Kinaseabhängigkeit der pan-nukleären H2AX-Phosphorylierung. Nach Behandlung mit hypotoner Lösung konnte die kernweite Antwort durch unspezifische PIKK-Inhibitoren, aber nicht durch gleichzeitige ATM- und DNA-PK-Inhibition unterdrückt werden (Baure et al., 2009) (Abb. 48), während nach Ionenbestrahlung die kernweite Antwort eindeutig von ATM und DNA-PK abhängig ist (vergleiche Kapitel 5.2.3).

Insgesamt lässt sich also sagen, dass Acetylierung die kernweite Antwort zwar verstärkt, aber nicht alleine auslösen konnte. Ein Einfluss einer globalen Chromatinstrukturveränderung lässt sich anhand der in dieser Arbeit gezeigten und in unserer Arbeitsgruppe vorhandenen Daten nicht vollkommen ausschließen, aber es sind keine Hinweise vorhanden, die für eine globale Chromatinstrukturveränderung sprechen.

#### **5.4.3 DNA-Enden und DNA-Fragmente als Auslöser der kernweiten Antwort**

Bei Beschädigung der DNA wird ATM über verschiedene Modifikationen wie Autophosphorylierung und Acetylierung aktiviert und an den DNA-Schaden rekrutiert (Bhatti et al., 2011), während DNA-PK erst bei Bindung an den DNA-Schaden aktiviert wird (Neal und Meek, 2011). Da einmal gebundenes ATM und DNA-PK an den DNA-Schäden nicht verbleibt, sondern beide Kinasen einem ständigen Austausch am DNA-Schaden unterlegen sind (Davis et al., 2010), wäre es vorstellbar, dass die kernweite Aktivität von ATM und DNA-PK durch Diffusion vom DNA-Ende weg in aktivierter Form zustande kommt. DNA-PK bildet jedoch erst an DNA-Enden einen vollständigen Enzymkomplex und eine Aktivität von DNA-PK bzw. der katalytischen Untereinheit DNA-PKcs in Entfernung von DNA-Enden wurde im Zusammenhang mit ionisierender Strahlung noch nicht beschrieben. Es ist bisher nicht vollständig geklärt, wie die Inaktivierung und Dissoziation von DNA-PK miteinander koordiniert werden. Die Dissoziation von DNA-PKcs geht mit der Phosphorylierung von DNA-PKcs einher (Chan und Lees-Miller, 1996; Merkle et al., 2002) und der Austausch von DNA-PKcs am DNA-Schaden ist durch eine verringerte Kinaseaktivität reduziert wie der Vergleich von normaler DNA-PKcs und Kinase-defizienter DNA-PKcs mittels FRAP-Analyse zeigte (Uematsu et al., 2007). Das

deutet darauf hin, dass Autophosphorylierung von DNA-PKcs zur Dissoziation von DNA-PKcs führt. Die Kinase-Inaktivierung von DNA-PKcs wird durch Phosphorylierung an Threonin 3950 verursacht, ohne jedoch die Bindung von DNA-PKcs an die DNA zu verringern (Douglas et al., 2007). Dabei ist nicht geklärt, ob es sich bei T3950 um eine Autophosphorylierungsstelle von DNA-PKcs handelt (Neal und Meek, 2011). Die Inaktivierung von DNA-PKcs könnte daher erst nach der Dissoziation vom DNA-Ende durch ein zweites Enzym vermittelt werden, so dass Dissoziation und Inaktivierung voneinander getrennt koordinierte Prozesse sein könnten. Es ist daher nicht auszuschließen, dass DNA-PKcs nach Ablösen vom DNA-Ende in aktiver Form durch den Zellkern diffundieren kann.

Quanz et al. (2009a) zeigen eine massive Aktivierung von DNA-PK nach Transfektion von Zellen mit nur 32 bp langen doppelsträngigen DNA-Fragmenten. Shiotani und Zou (2009) analysierten die Aktivierbarkeit von ATM *in vitro* durch verschiedene DNA-Fragmente und konnten unter anderem eine ATM-Aktivierung durch 20 bp doppelsträngige DNA nachweisen. Beide Kinasen können also auch durch kurze DNA-Fragmente aktiviert werden. Schwerionenbestrahlung führt zur Entstehung von DSBs in enger räumlicher Nähe wie durch Fragmentlängenbestimmung mittels Puls-Feld-Gelelektrophorese bestätigt werden konnte (Löbrich et al., 1996). Es ist daher vorstellbar, dass sich kurze DNA-Fragmente aus dem Chromatin lösen könnten und diese Fragmente möglicherweise durch den Zellkern diffundieren und dabei ATM und DNA-PK aktivieren. Untersuchungen von Radulescu et al. (2004) deuten darauf hin, dass bei hohem LET beeinflusst durch die Struktur des Chromatins vor allem DNA-Fragmente im Bereich von 10 kb bis 1 Mbp entstehen. Diese Daten sind in Übereinstimmung mit einer neueren Version des LEM, bei der die Entstehung von DSBs im Bereich unterhalb von 2 Megabasenpaaren berücksichtigt wird (Friedrich et al., 2011). Es ist allerdings fraglich, ob DNA-Fragmente in dieser Größenordnung durch den Zellkern diffundieren können. Beide Prozesse, Diffusion vom DNA-Ende weg und möglicherweise in geringem Umfang an kurze DNA-Fragmente gebunden, könnten aber auch parallel stattfinden. Dabei könnte die Entstehung von kurzen DNA-Fragmenten durch Nukleasen gefördert werden. Wenn Nukleasen DNA-Enden durch Resektion verkürzen, könnte sich das Ende des DNA-Stranges einem ESB nähern, so dass sich möglicherweise kurze einzelsträngige DNA-Stücke von der DNA lösen. Wenn sich diese auf sich selbst zurückfalten, entstehen wiederum doppelsträngige DNA-Fragmente, die DNA-PK und ATM aktivieren könnten. So zeigten Jazayeri et al. (2008), dass MRN-abhängig einzelsträngige DNA-Stücke entstehen können, die ATM aktivieren. Da Mre11 und CtIP die frühen Schritte der Prozessierung von DNA-Enden vermitteln (Mimitou und Symington, 2011) und beide auch in G1-Zellen aktiv sein können (Yun und Hiom, 2009; Quennet et al., 2011), wurde in dieser Arbeit die Rolle dieser beiden Nukleasen bei der H2AX-Phosphorylierung untersucht.

Eine Unterdrückung der Expression von CtIP oder Mre11 oder beider Nukleasen gleichzeitig konnte die Phosphorylierung von H2AX jedoch nicht verringern (Abb. 38 und 39). Diese Ergebnisse lassen nicht darauf schließen, dass die Entstehung von DNA-Fragmenten durch Resektion verstärkt wird. Interessanterweise war entgegen den ersten Vermutungen bei Unterdrückung von Mre11 das  $\gamma$ H2AX-Signal sogar etwas verstärkt. Die Mre11-Aktivität scheint der kernweiten Phosphorylierung also eher entgegen zu wirken. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass Mre11 möglicherweise entweder durch Prozessierung von DNA-Enden oder durch eine Förderung des Abbaus von DNA-Fragmenten die Aktivierung von ATM und DNA-PK verringert. Shiotani und Zou (2009) konnten zeigen, dass nach Resektion von DNA-Enden die ATM-Aktivität von einer ATR-Aktivität abgelöst

wird und es zur Inaktivierung von ATM kommt. Resektion leitet außerdem die DSB-Reparatur durch HR ein, wobei die Reparatur durch NHEJ verhindert wird (Symington und Gautier, 2011). Es wird beschrieben, dass Mre11 durch Prozessierung von DNA-Enden die Bindung von Ku verringert (Mimitou und Symington, 2010; Foster et al., 2011). Diese Daten stehen im Einklang mit einer möglichen Verringerung der ATM- und DNA-PK-Aktivität durch Nuklease-Aktivität. Möglicherweise führt eine schnelle Prozessierung der meisten DNA-Enden oder der Abbau von DNA-Fragmenten zum schnellen Rückgang der kernweiten ATM- und DNA-PK-Aktivität und damit zur schnellen Rückbildung von pan-nukleärem  $\gamma$ H2AX (Abb. 25), während die Reparatur von DSBs gerade nach Bestrahlung mit hohem LET wie Goldionenbestrahlung nicht abgeschlossen ist, so dass die  $\gamma$ H2AX-Foci noch verbleiben (Abb. 23).

Es wäre jedoch überraschend, wenn zwar Mre11 durch Prozessierung von DNA-Enden oder DNA-Fragmenten die kernweite Antwort beeinflusst, CtIP jedoch keinen Einfluss darauf hat, obwohl gezeigt wurde, dass beide Nukleasen miteinander interagieren und beide wahrscheinlich über einen gemeinsamen Mechanismus die Resektion bei HR vermitteln (Sartori et al., 2007). Es wird angenommen, dass Mre11 und CtIP die initiale Resektion vermitteln, wobei die genaue Interaktion beider Nukleasen miteinander noch nicht vollständig aufgeklärt ist (You und Bailis, 2010). Auch die Prozessierung von blockierten DNA-Enden, die beispielsweise durch Spo11 oder Topoisomerase gebunden sind, geschieht über Mre11 und CtIP (Longhese et al., 2010). Möglicherweise wird eine Reduzierung der kernweiten Antwort durch eine Mre11-vermittelte Prozessierung gefördert, die unabhängig von CtIP ist. Erst kürzlich stellten Garcia et al. (2011) ein Modell für die Prozessierung von blockierten 5'-Enden vor bei der die 3'-5'-Exonukleasaktivität von Mre11 benötigt wird. Mre11 ist jedoch ein Bestandteil des MRN-Komplex, der nicht nur über die Nuklease-Aktivität die Reparatur beeinflusst, sondern auch an der Erkennung von DNA-Schäden beteiligt ist und DNA-Enden vernetzen und damit diese stabilisieren kann (Williams et al., 2010). Einem möglichen Einfluss von Mre11 auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung könnten also verschiedene Mechanismen zugrunde liegen. Die Bedeutung von Mre11 für die Rückbildung des kernweiten  $\gamma$ H2AX nach Ionenbestrahlung müsste jedoch zunächst erst durch Untersuchungen innerhalb eines längeren Zeitraums nach Bestrahlung bestätigt werden.

Quanz et al. (2009a) zeigen nach Transfektion von DNA-Fragmenten eine starke Reaktion der Zelle, eine 6- bis 10-fach stärkere H2AX-Phosphorylierung als nach 10 Gy ionisierender Bestrahlung in der Immunoblot-Analyse. Hier sind die Fragmente mittels Modifikation der Enden vor dem Abbau durch Nukleasen geschützt. Möglicherweise würde die kernweite Reaktion deutlich schwächer ausfallen, wenn dieser Schutz vor Resektion nicht bestehen würde. Und eventuell wird die von den Autoren beschriebene Alles-oder-Nichts-Reaktion der Zelle und das lange Andauern der H2AX-Phosphorylierung, was sich klar von der Reaktion nach Ionenbestrahlung unterscheidet, durch die nicht resektierbaren Fragmente begünstigt. Eine starke Reaktion der Zelle ist in diesem Fall jedoch von den Autoren gewünscht, da durch Inaktivierung der DNA-Reparatur ein therapeutischer Effekt erzielt werden soll, während nach Ionenbestrahlung anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen keine Inhibition der DNA-Reparatur durch die kernweite Reaktion zu erwarten ist (vergleiche Kapitel 5.3.2).

Viele Untersuchungen der vorliegenden Arbeit stehen im Einklang mit einem direkten Zusammenhang zwischen DNA-Enden oder DNA-Fragmenten und der pan-nukleären H2AX-Phosphorylierung

nach Ionenbestrahlung. Es wurde gezeigt, dass nur Bestrahlung des Zellkerns, nicht des Cytoplasmas die Induktion der kernweiten H2AX-Phosphorylierung auslöst (Abb. 19). Darüber hinaus besteht ein direkter Zusammenhang zwischen der deponierten Dosis und der Stärke der H2AX-Phosphorylierung (Abb. 22). Es wurde außerdem gezeigt, dass bei Bestrahlung mit höherem LET und damit einer höheren Schadensdichte mehr DNA-PK aktiviert wird (Abb. 34). Desweiteren ist die kernweite Antwort durch die Kinasen ATM und DNA-PK katalysiert (Abb. 30 und 31), die beide durch DNA-Enden und DNA-Fragmente aktiviert werden können, während die kernweite Antwort nach Chromatinstrukturveränderungen wahrscheinlich eine andere Kinase-Abhängigkeit aufweist (Abb. 48). Die genaue Ursache für die kernweite H2AX-Phosphorylierung konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht eindeutig nachgewiesen werden.

### **5.5 Modell für die pan-nukleäre H2AX-Phosphorylierung**

Im Folgenden sollen aus den in dieser Arbeit gewonnenen Erkenntnissen über die Regulierung der kernweiten H2AX-Phosphorylierung nach Ionenbestrahlung ein mögliches Modell für den Ablauf der kernweiten Reaktion vorgestellt werden. Da der genaue Auslöser der kernweiten Antwort nicht aufgedeckt werden konnte, jedoch keine deutlichen Hinweise auf eine globale Chromatinstrukturveränderung vorliegen und die Untersuchungen im Einklang mit einer möglichen Diffusion der Kinasen stehen, wird ein Modell beschrieben, bei dem eine Diffusion der Kinasen vom DNA-Ende weg und an DNA-Fragmente gebunden zugrunde liegt.

Zunächst werden durch dicht ionisierende Bestrahlung mit schweren Ionen DNA-Schäden auf engem Raum hervorgerufen, wodurch DSBs und dadurch auch DNA-Fragmente in räumlicher Nähe entstehen. ATM und DNA-PK werden über NBS1 bzw. Ku70/Ku80 an DNA-Enden rekrutiert (Falck et al., 2005). Einmal gebundene Reparaturfaktoren bleiben aber nicht bis zum Abschluss der Reparatur gebunden, sondern es herrscht ein ständiger Austausch vor, so dass gebundenes Protein wie Ku70/Ku80, DNA-PKcs, ATM oder NBS1 wieder weg diffundiert und neues Protein binden kann (Mari et al., 2006; Uematsu et al., 2007; Davis et al., 2010; Lukas et al., 2003). Das Ablösen vom DNA-Schaden muss aber nicht mit einer Inaktivierung von ATM und DNA-PK einhergehen. Beide könnten sich in aktiver Form entweder ungebunden oder auch an diffundierende DNA-Fragmente gebunden durch das Nukleoplasma bewegen (vergleiche voriges Kapitel). Dadurch können ATM und DNA-PK im gesamten Zellkern auch in Bereichen ohne DNA-Schäden H2AX phosphorylieren, aber möglicherweise auch andere ihrer Zielproteine. Die Ergebnisse dieser Arbeit (vergleiche Kapitel 5.3.2) sprechen dafür, dass MDC1 auch im nicht beschädigten Bereich des Chromatins bindet und dadurch in Übereinstimmung mit Untersuchungen von Lou et al. (2006) ATM und DNA-PK zusätzlich zum unbeschädigten Chromatin geleitet werden und beide H2AX verstärkt phosphorylieren. Es kommt also zur kernweiten MDC1-Bindung und einer Erhöhung des  $\gamma$ H2AX-Signals, wobei die Bindung von MDC1 in der Nähe des DNA-Schadens dadurch verringert ist (Abb. 46). Für die Rekrutierung weiterer Proteine scheinen zusätzlich nötige Signale kernweit zu fehlen, da kein Einfluss auf andere Reparaturfaktoren festgestellt werden konnte (vergleiche Kapitel 5.3). Innerhalb weniger Stunden nach Bestrahlung wird die Aktivierung von ATM und DNA-PK wieder verringert (Abb. 25), was darüber vermittelt werden könnte, dass DNA-Enden prozessiert werden und DNA-Fragmente abgebaut werden. Möglicherweise hat die Aktivität von Mre11 einen besonderen Einfluss auf diesen Prozess, da bei Abwesenheit von Mre11 pan-nukleäres  $\gamma$ H2AX verstärkt war (Abb. 39). ATR



könnte die entstehenden einzelsträngigen Bereiche stabilisieren, da durch Abwesenheit von ATM die kernweite Antwort erhöht war (Abb. 35). Bei sinkender Menge der kernweit aktiven Kinasen würde die Dephosphorylierung von H2AX gegenüber der Phosphorylierung von H2AX überwiegen, so dass die Menge an kernweisem  $\gamma$ H2AX abnimmt. Nach ungefähr 8 Stunden könnte der immer noch vorhandene Anteil an schwer reparierbaren DNA-Schäden (Abb. 26) eine andauernde Rekrutierung und Aktivierung von ATM und DNA-PK mit anschließender Diffusion der Kinasen bewirken. Dadurch könnte eine schwächere kernweite Aktivität von ATM und DNA-PK aufrecht erhalten bleiben.

## 5.6 Ausblick

Das im vorigen Kapitel vorgestellte Modell würde bedeuten, dass es sich bei der pan-nukleären Phosphorylierung von H2AX nicht um einen aktiv angeschalteten Prozess handelt, sondern dass die Phosphorylierung durch Diffusion in Abhängigkeit von der induzierten Schadensmenge stattfindet und auch bei geringen Dosen in sehr geringem Umfang passiert. Daher wäre eher nicht zu erwarten, dass die kernweite Reaktion nach ionisierender Bestrahlung eine Funktion erfüllt. Für  $\gamma$ H2AX wurden Funktionen bei der Akkumulation von Reparaturfaktoren, Beeinflussung von Resektion und Stabilisierung von DNA-Enden postuliert (vergleiche Kapitel 2.3.2). Für kernweites  $\gamma$ H2AX bei Abwesenheit von DNA-Schäden erscheint eine Beeinflussung von Resektion als sehr unwahrscheinlich und es wurde keine kernweite Akkumulation von Einzelstrang-Markern wie RPA beobachtet (Abb. 41 und Jakob et al. (2009)). Auch eine Akkumulation von Reparaturproteinen in diesem Bereich erscheint nicht sinnvoll, sondern eher nachteilig für die Effizienz der Reparatur. Zudem findet zwar eine kernweite Bindung von MDC1 statt, jedoch gibt es keine Hinweise auf eine starke kernweite Bindung von weiteren Faktoren. Eine kurzfristige Stabilisierung der DNA könnte sich zwar bei längerer Exposition schädlicher Einflüsse positiv auswirken, so dass beispielsweise das Auseinanderdriften von später entstandenen DNA-Enden verringert werden könnte, jedoch ist die kernweite H2AX-Phosphorylierung besonders bei Ionenbestrahlung mit relativ geringem LET nicht sehr stark, so dass es fraglich ist, ob sich ein derartiger Effekt ergibt. Insgesamt liegt eher die Vermutung nahe, dass es sich bei der kernweiten H2AX-Phosphorylierung um eine kurzfristige, möglicherweise nicht spezifische Nebenreaktion bei starker Beschädigung der DNA handelt. Anhand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen ergeben sich jedoch Fragen, die noch nicht umfassend beantwortet werden konnten.

Zum einen konnte der genaue Mechanismus hinter der kernweiten Aktivität von ATM und DNA-PK nicht aufgedeckt werden. Diese ließe sich durch eine mögliche Diffusion von ATM und DNA-PK vom DNA-Ende weg erklären. Allerdings wird DNA-PK erst am DNA-Ende zum vollständigen Enzymkomplex zusammengefügt (Meek et al., 2008) und eine Aktivität von DNA-PK in räumlicher Entfernung von DNA-Enden wurde noch nicht beschrieben. Um zu überprüfen, ob nach Ionenbestrahlung aktivierte DNA-PKs durch den Zellkern diffundiert, könnte nach Ionenbestrahlung ein Proteinextrakt aus nukleoplasmatischem Protein gewonnen werden und die DNA-PK-Aktivität im *in-vitro*-Kinase-Assay untersucht werden. Allerdings wird bei dieser Methode, um eine hohe Sensitivität der Messung zu gewährleisten, die Übertragung von radioaktiv markiertem Phosphat auf das Substrat der Kinase quantifiziert. Die Durchführung von Experimenten mit radioaktiven Substanzen war jedoch in unserem Labor nicht möglich.

DNA-PK könnte aber auch an DNA-Fragmente gebunden sein und auf diese Weise in aktiver Form

durch den Zellkern diffundieren. Diese Möglichkeit könnte untersucht werden, indem nach Ionenbestrahlung eine Vernetzung von DNA und Protein vorgenommen wird und anschließend mittels Immunpräzipitation von DNA-PK überprüft wird, ob kurze DNA-Fragmente an DNA-PK gebunden sind. Mittels Electrophoretic-Mobility-Shift-Assay könnte überprüft werden, ob diese DNA-Fragmente durch gebundene DNA-PK bei der Auftrennung im Gel verlangsamt sind. Bei dieser Methode könnten jedoch während der Aufarbeitung zusätzliche DNA-Fragmente entstehen, die den Nachweis der bestrahlungsabhängigen DNA-Fragmente stören würden. Außerdem sind die durch Bestrahlung entstandenen DNA-Fragmente von unterschiedlicher Größe und nach den verwendeten Dosen wahrscheinlich nicht in großer Menge vorhanden, so dass für eine ausreichende Sensitivität des Nachweises die DNA radioaktiv markiert werden müsste.

Auch eine potentielle globale Chromatinstrukturveränderung nach Schwerionenbestrahlung könnte die kernweite Aktivität der Kinasen bewirken. In dieser Arbeit konnte jedoch kein Einfluss von Acetylierung auf das Auslösen der pan-nukleären H2AX-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abb. 37). Allerdings wird das Chromatin nach Beschädigung der DNA über viele unterschiedliche Modifikationen der Histone und durch Chromatin-Remodeling-Komplexe verändert, wobei eine Vielzahl an Proteinen beteiligt ist (Lukas et al., 2011). Es ist daher nicht auszuschließen, dass die kernweite Kinase-Aktivität nach Schwerionenbestrahlung durch acetylierungsunabhängige Chromatinstrukturveränderungen vermittelt wird. Ein erster Schritt bei der Untersuchung dieser Möglichkeit wäre die gezielte Herunterregulierung einzelner Komponenten von Chromatin-Remodeling-Komplexen und die Überprüfung der Wirkung auf die kernweite H2AX-Phosphorylierung.

Im Rahmen der in dieser Arbeit vorgenommenen Untersuchungen stellte sich heraus, dass die DNA-Reparatur wahrscheinlich nur in geringem Umfang von pan-nukleärem  $\gamma$ H2AX beeinflusst wird, da zwar eine kernweite MDC1-Bindung, jedoch kein starker Einfluss auf andere Reparaturproteine festgestellt werden konnte (vergleiche Kapitel 5.3). Um einen möglichen geringen Einfluss von kernweisem  $\gamma$ H2AX auf die Effizienz der DNA-Reparatur direkt zu untersuchen, müsste die Entstehung von pan-nukleärem  $\gamma$ H2AX unterdrückt werden. Dies ist jedoch nur durch Inhibition von ATM und DNA-PK möglich, zwei wichtigen Kinasen der DNA-Schadensantwort, so dass die DNA-Reparatur ebenfalls beeinträchtigt wäre. Ein möglicher geringer Beitrag der pan-nukleären H2AX-Phosphorylierung zur biologischen Wirksamkeit von Schwerionenstrahlen kann also nicht direkt überprüft werden, ein starker Einfluss der kernweiten H2AX-Phosphorylierung ist jedoch anhand der in dieser Arbeit gezeigten Ergebnisse nicht zu erwarten.

## 6 Literaturverzeichnis

- Agarwal, S., Tafel, A. A., und Kanaar, R. (2006). DNA double-strand break repair and chromosome translocations. *DNA Repair (Amst)*, 5(9-10):1075–1081.
- Ahnesorg, P., Smith, P., und Jackson, S. P. (2006). XLF interacts with the XRCC4-DNA ligase IV complex to promote DNA nonhomologous end-joining. *Cell*, 124(2):301–313.
- Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., und Walter, P. (2001). *Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie*. WILEY-VCH.
- Arva, N. C., Gopen, T. R., Talbott, K. E., Campbell, L. E., Chicas, A., White, D. E., Bond, G. L., Levine, A. J., und Bargonetti, J. (2005). A chromatin-associated and transcriptionally inactive p53-Mdm2 complex occurs in mdm2 SNP309 homozygous cells. *J Biol Chem*, 280(29):26776–26787.
- Asaithamby, A. und Chen, D. J. (2011). Mechanism of cluster DNA damage repair in response to high-atomic number and energy particles radiation. *Mutat Res*, 711(1-2):87–99.
- Ashwood-Smith, M. J. (1975). Current concepts concerning radioprotective and cryoprotective properties of dimethyl sulfoxide in cellular systems. *Ann N Y Acad Sci*, 243:246–256.
- Averbeck, N. B. und Durante, M. (2011). Protein acetylation within the cellular response to radiation. *J Cell Physiol*, 226(4):962–967.
- Bakkenist, C. J. und Kastan, M. B. (2003). DNA damage activates ATM through intermolecular autophosphorylation and dimer dissociation. *Nature*, 421(6922):499–506.
- Bassing, C. H. und Alt, F. W. (2004). H2AX may function as an anchor to hold broken chromosomal DNA ends in close proximity. *Cell Cycle*, 3(2):149–153.
- Bassing, C. H., Chua, K. F., Sekiguchi, J., Suh, H., Whitlow, S. R., Fleming, J. C., Monroe, B. C., Ciccone, D. N., Yan, C., Vlasakova, K., Livingston, D. M., Ferguson, D. O., Scully, R., und Alt, F. W. (2002). Increased ionizing radiation sensitivity and genomic instability in the absence of histone H2AX. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(12):8173–8178.
- Baure, J., Izadi, A., Suarez, V., Giedzinski, E., Cleaver, J. E., Fike, J. R., und Limoli, C. L. (2009). Histone H2AX phosphorylation in response to changes in chromatin structure induced by altered osmolarity. *Mutagenesis*, 24(2):161–167.
- Becherel, O. J., Jakob, B., Cherry, A. L., Gueven, N., Fusser, M., Kijas, A. W., Peng, C., Katyal, S., McKinnon, P. J., Chen, J., Epe, B., Smerdon, S. J., Taucher-Scholz, G., und Lavin, M. F. (2010). CK2 phosphorylation-dependent interaction between aprataxin and MDC1 in the DNA damage response. *Nucleic Acids Res*, 38(5):1489–1503.
- Belmont, A. S. (2006). Mitotic chromosome structure and condensation. *Curr Opin Cell Biol*, 18(6):632–638.
- Bethe, H. (1930). Zur Theorie des Durchgangs schneller Korpuskularstrahlen durch Materie. *Annalen der Physik*, 397:325 – 400.
- Beucher, A., Birraux, J., Tchouandong, L., Barton, O., Shibata, A., Conrad, S., Goodarzi, A. A., Krempler, A., Jeggo, P. A., und Löbrich, M. (2009). ATM and Artemis promote homologous recombination of radiation-induced DNA double-strand breaks in G2. *EMBO J*, 28(21):3413–3427.
- Bhatti, S., Kozlov, S., Farooqi, A. A., Naqi, A., Lavin, M., und Khanna, K. K. (2011). ATM protein kinase: the linchpin of cellular defenses to stress. *Cell Mol Life Sci*, 68(18):2977–3006.
- Bloch, F. (1933). Zur Bremsung rasch bewegter Teilchen beim Durchgang durch die Materie. *Annalen der Physik*, 408:285 – 320.

- Boehme, K. A., Kulikov, R., und Blattner, C. (2008). p53 stabilization in response to DNA damage requires Akt/PKB and DNA-PK. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(22):7785–7790.
- Bouquet, F., Ousset, M., Biard, D., Fallone, F., Dauvillier, S., Frit, P., Salles, B., und Muller, C. (2011). A DNA-dependent stress response involving DNA-PK occurs in hypoxic cells and contributes to cellular adaptation to hypoxia. *J Cell Sci*, 124(Pt 11):1943–1951.
- Brown, E. J. und Baltimore, D. (2000). ATR disruption leads to chromosomal fragmentation and early embryonic lethality. *Genes Dev*, 14(4):397–402.
- Celeste, A., Fernandez-Capetillo, O., Kruhlak, M. J., Pilch, D. R., Staudt, D. W., Lee, A., Bonner, R. F., Bonner, W. M., und Nussenzweig, A. (2003). Histone H2AX phosphorylation is dispensable for the initial recognition of DNA breaks. *Nat Cell Biol*, 5(7):675–679.
- Celeste, A., Petersen, S., Romanienko, P. J., Fernandez-Capetillo, O., Chen, H. T., Sedelnikova, O. A., Reina-San-Martin, B., Coppola, V., Meffre, E., Difilippantonio, M. J., Redon, C., Pilch, D. R., Oлару, A., Eckhaus, M., Camerini-Otero, R. D., Tessarollo, L., Livak, F., Manova, K., Bonner, W. M., Nussenzweig, M. C., und Nussenzweig, A. (2002). Genomic instability in mice lacking histone H2AX. *Science*, 296(5569):922–927.
- Chan, D. W., Gately, D. P., Urban, S., Galloway, A. M., Lees-Miller, S. P., Yen, T., und Allalunis-Turner, J. (1998). Lack of correlation between ATM protein expression and tumour cell radiosensitivity. *Int J Radiat Biol*, 74(2):217–224.
- Chan, D. W. und Lees-Miller, S. P. (1996). The DNA-dependent protein kinase is inactivated by autophosphorylation of the catalytic subunit. *J Biol Chem*, 271(15):8936–8941.
- Chanoux, R. A., Yin, B., Urtishak, K. A., Asare, A., Bassing, C. H., und Brown, E. J. (2009). ATR and H2AX cooperate in maintaining genome stability under replication stress. *J Biol Chem*, 284(9):5994–6003.
- Chapman, J. D., Reuvers, A. P., Borsa, J., und Greenstock, C. L. (1973). Chemical radioprotection and radiosensitization of mammalian cells growing in vitro. *Radiat Res*, 56(2):291–306.
- Chen, B. P. C., Uematsu, N., Kobayashi, J., Lerenthal, Y., Krempler, A., Yajima, H., Löbrich, M., Shiloh, Y., und Chen, D. J. (2007). Ataxia telangiectasia mutated (ATM) is essential for DNA-PKcs phosphorylations at the Thr-2609 cluster upon DNA double strand break. *J Biol Chem*, 282(9):6582–6587.
- Chen, H. T., Bhandoola, A., Difilippantonio, M. J., Zhu, J., Brown, M. J., Tai, X., Rogakou, E. P., Brotz, T. M., Bonner, W. M., Ried, T., und Nussenzweig, A. (2000). Response to RAG-mediated VDJ cleavage by NBS1 and gamma-H2AX. *Science*, 290(5498):1962–1965.
- Chowdhury, D., Keogh, M.-C., Ishii, H., Peterson, C. L., Buratowski, S., und Lieberman, J. (2005). gamma-H2AX dephosphorylation by protein phosphatase 2A facilitates DNA double-strand break repair. *Mol Cell*, 20(5):801–809.
- Chowdhury, D., Xu, X., Zhong, X., Ahmed, F., Zhong, J., Liao, J., Dykxhoorn, D. M., Weinstock, D. M., Pfeifer, G. P., und Lieberman, J. (2008). A PP4-phosphatase complex dephosphorylates gamma-H2AX generated during DNA replication. *Mol Cell*, 31(1):33–46.
- Cimprich, K. A. und Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9(8):616–627.
- Collaco, R. F., Bevington, J. M., Bhargu, V., Kalman-Maltese, V., und Trempe, J. P. (2009). Adeno-associated virus and adenovirus coinfection induces a cellular DNA damage and repair response via redundant phosphatidylinositol 3-like kinase pathways. *Virology*, 392(1):24–33.
- Coller, H. A. (2007). What's taking so long? S-phase entry from quiescence versus proliferation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8(8):667–670.
- Cook, P. J., Ju, B. G., Telese, F., Wang, X., Glass, C. K., und Rosenfeld, M. G. (2009). Tyrosine dephosphorylation of H2AX modulates apoptosis and survival decisions. *Nature*, 458(7238):591–596.
- Cortez, D., Guntuku, S., Qin, J., und Elledge, S. J. (2001). ATR and ATRIP: partners in checkpoint signaling. *Science*, 294(5547):1713–1716.

- Cui, X., Yu, Y., Gupta, S., Cho, Y.-M., Lees-Miller, S. P., und Meek, K. (2005). Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol Cell Biol*, 25(24):10842–10852.
- Davies, S. L., North, P. S., Dart, A., Lakin, N. D., und Hickson, I. D. (2004). Phosphorylation of the Bloom's syndrome helicase and its role in recovery from S-phase arrest. *Mol Cell Biol*, 24(3):1279–1291.
- Davis, A. J., So, S., und Chen, D. J. (2010). Dynamics of the PI3K-like protein kinase members ATM and DNA-PKcs at DNA double strand breaks. *Cell Cycle*, 9(13):2529–2536.
- de Feraudy, S., Revet, I., Bezrookove, V., Feeney, L., und Cleaver, J. E. (2010). A minority of foci or pan-nuclear apoptotic staining of gammaH2AX in the S phase after UV damage contain DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(15):6870–6875.
- Deckbar, D., Jeggo, P. A., und Löbrich, M. (2011). Understanding the limitations of radiation-induced cell cycle checkpoints. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, 46(4):271–283.
- DeFazio, L. G., Stansel, R. M., Griffith, J. D., und Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J*, 21(12):3192–3200.
- Diderich, K., Alanazi, M., und Hoeijmakers, J. H. J. (2011). Premature aging and cancer in nucleotide excision repair-disorders. *DNA Repair (Amst)*, 10(7):772–780.
- Doetsch, P. W. und Cunningham, R. P. (1990). The enzymology of apurinic/apyrimidinic endonucleases. *Mutat Res*, 236(2-3):173–201.
- Douglas, P., Cui, X., Block, W. D., Yu, Y., Gupta, S., Ding, Q., Ye, R., Morrice, N., Lees-Miller, S. P., und Meek, K. (2007). The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is phosphorylated in vivo on threonine 3950, a highly conserved amino acid in the protein kinase domain. *Mol Cell Biol*, 27(5):1581–1591.
- Douglas, P., Zhong, J., Ye, R., Moorhead, G. B. G., Xu, X., und Lees-Miller, S. P. (2010). Protein phosphatase 6 interacts with the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit and dephosphorylates gamma-H2AX. *Mol Cell Biol*, 30(6):1368–1381.
- Durante, M. und Cucinotta, F. A. (2008). Heavy ion carcinogenesis and human space exploration. *Nat Rev Cancer*, 8(6):465–472.
- Durante, M. und Loeffler, J. S. (2010). Charged particles in radiation oncology. *Nat Rev Clin Oncol*, 7(1):37–43.
- Elsässer, T., Brons, S., Psonka, K., Scholz, M., Gudowska-Nowak, E., und Taucher-Scholz, G. (2008). Biophysical modeling of fragment length distributions of DNA plasmids after X and heavy-ion irradiation analyzed by atomic force microscopy. *Radiat Res*, 169(6):649–659.
- Elsässer, T. und Scholz, M. (2007). Cluster effects within the local effect model. *Radiat Res*, 167(3):319–329.
- Escargueil, A. E., Soares, D. G., Salvador, M., Larsen, A. K., und Henriques, J. A. P. (2008). What histone code for DNA repair? *Mutat Res*, 658(3):259–270.
- Ewald, B., Sampath, D., und Plunkett, W. (2007). H2AX phosphorylation marks gemcitabine-induced stalled replication forks and their collapse upon S-phase checkpoint abrogation. *Mol Cancer Ther*, 6(4):1239–1248.
- Falck, J., Coates, J., und Jackson, S. P. (2005). Conserved modes of recruitment of ATM, ATR and DNA-PKcs to sites of DNA damage. *Nature*, 434(7033):605–611.
- Fernandez-Capetillo, O., Chen, H.-T., Celeste, A., Ward, I., Romanienko, P. J., Morales, J. C., Naka, K., Xia, Z., Camerini-Otero, R. D., Motoyama, N., Carpenter, P. B., Bonner, W. M., Chen, J., und Nussenzweig, A. (2002). DNA damage-induced G2-M checkpoint activation by histone H2AX and 53BP1. *Nat Cell Biol*, 4(12):993–997.
- Finnie, N. J., Gottlieb, T. M., Blunt, T., Jeggo, P. A., und Jackson, S. P. (1995). DNA-dependent protein kinase activity is absent in xrs-6 cells: implications for site-specific recombination and DNA double-strand break repair. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92(1):320–324.

- Fischer, B. E., Heiß, M., und Cholewa, M. (2003). About the art to shoot with single ions. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*, B 210:285–291.
- Foster, S. S., Balestrini, A., und Petrini, J. H. J. (2011). Functional interplay of the Mre11 nuclease and Ku in the response to replication-associated DNA damage. *Mol Cell Biol*, 31(21):4379–4389.
- Fournier, C., Barberet, P., Pouthier, T., Ritter, S., Fischer, B., Voss, K. O., Funayama, T., Hamada, N., Kobayashi, Y., und Taucher-Scholz, G. (2009). No evidence for DNA and early cytogenetic damage in bystander cells after heavy-ion microirradiation at two facilities. *Radiat Res*, 171(5):530–540.
- Fragkos, M., Breuleux, M., Clément, N., und Beard, P. (2008). Recombinant adeno-associated viral vectors are deficient in provoking a DNA damage response. *J Virol*, 82(15):7379–7387.
- Friedrich, T., Scholz, U., Elsässer, T., Durante, M., und Scholz, M. (2011). Calculation of the biological effects of ion beams based on the microscopic spatial damage distribution pattern. *Int J Radiat Biol*.
- Garcia, V., Phelps, S. E. L., Gray, S., und Neale, M. J. (2011). Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature*, 479(7372):241–244.
- Goodhead, D. T., Thacker, J., und Cox, R. (1993). Weiss Lecture. Effects of radiations of different qualities on cells: molecular mechanisms of damage and repair. *Int J Radiat Biol*, 63(5):543–556.
- Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T. E., Mann, M., und Lieber, M. R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature*, 388(6641):492–495.
- Greubel, C., Hable, V., Drexler, G. A., Hauptner, A., Dietzel, S., Strickfaden, H., Baur, I., Krücken, R., Cremer, T., Dollinger, G., und Friedl, A. A. (2008). Competition effect in DNA damage response. *Radiat Environ Biophys*, 47(4):423–429.
- Guikema, J. E. J., Linehan, E. K., Tsuchimoto, D., Nakabeppu, Y., Strauss, P. R., Stavnezer, J., und Schrader, C. E. (2007). APE1- and APE2-dependent DNA breaks in immunoglobulin class switch recombination. *J Exp Med*, 204(12):3017–3026.
- Hall, E. J. und Giaccia, A. J. (2006). *Radiobiology for the Radiologist*. Lippincott Williams & Wilkins.
- Happel, N. und Doenecke, D. (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene*, 431(1-2):1–12.
- Hargreaves, D. C. und Crabtree, G. R. (2011). ATP-dependent chromatin remodeling: genetics, genomics and mechanisms. *Cell Res*, 21(3):396–420.
- Hayes, J. J. und Wolffe, A. P. (1993). Preferential and asymmetric interaction of linker histones with 5S DNA in the nucleosome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(14):6415–6419.
- Hegde, M. L., Hazra, T. K., und Mitra, S. (2008). Early steps in the DNA base excision/single-strand interruption repair pathway in mammalian cells. *Cell Res*, 18(1):27–47.
- Heiss, M., Fischer, B. E., Jakob, B., Fournier, C., Becker, G., und Taucher-Scholz, G. (2006). Targeted irradiation of Mammalian cells using a heavy-ion microprobe. *Radiat Res*, 165(2):231–239.
- Herrlitz, M. (2010). Rolle der Resektion an DNA-Doppelstrangbrüchen in der Ionen-induzierten Strahlenantwort. Diplomarbeit, Goethe-Universität Frankfurt am Main.
- Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C. J., Green, S. J., Martin, N. M. B., Orr, A. I., Reaper, P. M., Jackson, S. P., Curtin, N. J., und Smith, G. C. M. (2004). Identification and characterization of a novel and specific inhibitor of the ataxia-telangiectasia mutated kinase ATM. *Cancer Res*, 64(24):9152–9159.
- Hill, R. und Lee, P. W. K. (2010). The DNA-dependent protein kinase (DNA-PK): More than just a case of making ends meet? *Cell Cycle*, 9(17):3460–3469.
- Hirayama, R., Ito, A., Tomita, M., Tsukada, T., Yatagai, F., Noguchi, M., Matsumoto, Y., Kase, Y., Ando, K., Okayasu, R., und Furusawa, Y. (2009). Contributions of direct and indirect actions in cell killing by high-LET radiations. *Radiat Res*, 171(2):212–218.

- Holthausen, J. T., Wyman, C., und Kanaar, R. (2010). Regulation of DNA strand exchange in homologous recombination. *DNA Repair (Amst)*, 9(12):1264–1272.
- Iacovoni, J. S., Caron, P., Lassadi, I., Nicolas, E., Massip, L., Trouche, D., und Legube, G. (2010). High-resolution profiling of gammaH2AX around DNA double strand breaks in the mammalian genome. *EMBO J*, 29(8):1446–1457.
- Ichijima, Y., Sakasai, R., Okita, N., Asahina, K., Mizutani, S., und Teraoka, H. (2005). Phosphorylation of histone H2AX at M phase in human cells without DNA damage response. *Biochem Biophys Res Commun*, 336(3):807–812.
- Ikura, T., Tashiro, S., Kakino, A., Shima, H., Jacob, N., Amunugama, R., Yoder, K., Izumi, S., Kuraoka, I., Tanaka, K., Kimura, H., Ikura, M., Nishikubo, S., Ito, T., Muto, A., Miyagawa, K., Takeda, S., Fishel, R., Igarashi, K., und Kamiya, K. (2007). DNA damage-dependent acetylation and ubiquitination of H2AX enhances chromatin dynamics. *Mol Cell Biol*, 27(20):7028–7040.
- Imai, K., Slupphaug, G., Lee, W.-I., Revy, P., Nonoyama, S., Catalan, N., Yel, L., Forveille, M., Kavli, B., Krokan, H. E., Ochs, H. D., Fischer, A., und Durandy, A. (2003). Human uracil-DNA glycosylase deficiency associated with profoundly impaired immunoglobulin class-switch recombination. *Nat Immunol*, 4(10):1023–1028.
- Jakob, B., Rudolph, J. H., Gueven, N., Lavin, M. F., und Taucher-Scholz, G. (2005). Live cell imaging of heavy-ion-induced radiation responses by beamline microscopy. *Radiat Res*, 163(6):681–690.
- Jakob, B., Scholz, M., und Taucher-Scholz, G. (2003). Biological imaging of heavy charged-particle tracks. *Radiat Res*, 159(5):676–684.
- Jakob, B., Splinter, J., Conrad, S., Voss, K.-O., Zink, D., Durante, M., Löbrich, M., und Taucher-Scholz, G. (2011). DNA double-strand breaks in heterochromatin elicit fast repair protein recruitment, histone H2AX phosphorylation and relocation to euchromatin. *Nucleic Acids Res*, 39(15):6489–6499.
- Jakob, B., Splinter, J., und Taucher-Scholz, G. (2009). Positional stability of damaged chromatin domains along radiation tracks in mammalian cells. *Radiat Res*, 171(4):405–418.
- Jazayeri, A., Balestrini, A., Garner, E., Haber, J. E., und Costanzo, V. (2008). Mre11-Rad50-Nbs1-dependent processing of DNA breaks generates oligonucleotides that stimulate ATM activity. *EMBO J*, 27(14):1953–1962.
- Jazayeri, A., Falck, J., Lukas, C., Bartek, J., Smith, G. C. M., Lukas, J., und Jackson, S. P. (2006). ATM- and cell cycle-dependent regulation of ATR in response to DNA double-strand breaks. *Nat Cell Biol*, 8(1):37–45.
- Jeggo, P. A., Geuting, V., und Löbrich, M. (2011). The role of homologous recombination in radiation-induced double-strand break repair. *Radiother Oncol*, 101(1):7–12.
- Jiang, X., Xu, Y., und Price, B. D. (2010). Acetylation of H2AX on lysine 36 plays a key role in the DNA double-strand break repair pathway. *FEBS Lett*, 584(13):2926–2930.
- Jungmichel, S. und Stucki, M. (2010). MDC1: The art of keeping things in focus. *Chromosoma*, 119(4):337–349.
- Kashishian, A., Douangpanya, H., Clark, D., Schlachter, S. T., Eary, C. T., Schiro, J. G., Huang, H., Burgess, L. E., Kesicki, E. A., und Halbrook, J. (2003). DNA-dependent protein kinase inhibitors as drug candidates for the treatment of cancer. *Mol Cancer Ther*, 2(12):1257–1264.
- Kass, B. (2011). Einfluss von Acetylierung auf die DNA-schadensabhängige H2AX-Phosphorylierung. Bachelorarbeit, Hochschule Darmstadt.
- Kiefer, J. und Kiefer, I. (2003). *Allgemeine Radiologie*. Parey Buchverlag.
- Kinner, A., Wu, W., Staudt, C., und Iliakis, G. (2008). Gamma-H2AX in recognition and signaling of DNA double-strand breaks in the context of chromatin. *Nucleic Acids Res*, 36(17):5678–5694.
- Kitajima, S., Nakamura, H., Adachi, M., Ijichi, K., Yasui, Y., Saito, N., Suzuki, M., Kurita, K., und Ishizaki, K. (2010). AT cells show dissimilar hypersensitivity to heavy-ion and X-rays irradiation. *J Radiat Res (Tokyo)*, 51(3):251–255.

- Knoop, K. (2009). Modulation der Chromatinzugänglichkeit nach Bestrahlung. Diplomarbeit, Technische Universität Darmstadt.
- Kodym, R. und Hörth, E. (1995). Determination of radiation-induced DNA strand breaks in individual cells by non-radioactive labelling of 3' OH ends. *Int J Radiat Biol*, 68(2):133–139.
- Kornberg, R. D. und Lorch, Y. (1999). Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell*, 98(3):285–294.
- Kozlov, S. V., Graham, M. E., Peng, C., Chen, P., Robinson, P. J., und Lavin, M. F. (2006). Involvement of novel autophosphorylation sites in ATM activation. *EMBO J*, 25(15):3504–3514.
- Kraft, G. (2008). Tumorthherapie mit schweren Ionen. *Verein zur Förderung der Tumorthherapie mit schweren Ionen e.V.*
- Krokan, H. E., Drabløs, F., und Slupphaug, G. (2002). Uracil in DNA—occurrence, consequences and repair. *Oncogene*, 21(58):8935–8948.
- Krysko, D. V., Berghe, T. V., D'Herde, K., und Vandenabeele, P. (2008). Apoptosis and necrosis: detection, discrimination and phagocytosis. *Methods*, 44(3):205–221.
- Kumagai, A., Lee, J., Yoo, H. Y., und Dunphy, W. G. (2006). TopBP1 activates the ATR-ATRIP complex. *Cell*, 124(5):943–955.
- Kurimasa, A., Ouyang, H., Dong, L. J., Wang, S., Li, X., Cordon-Cardo, C., Chen, D. J., und Li, G. C. (1999). Catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase: impact on lymphocyte development and tumorigenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96(4):1403–1408.
- Kusch, T., Florens, L., Macdonald, W. H., Swanson, S. K., Glaser, R. L., Yates, J. R., Abmayr, S. M., Washburn, M. P., und Workman, J. L. (2004). Acetylation by Tip60 is required for selective histone variant exchange at DNA lesions. *Science*, 306(5704):2084–2087.
- Löbrich, M., Cooper, P. K., und Rydberg, B. (1996). Non-random distribution of DNA double-strand breaks induced by particle irradiation. *Int J Radiat Biol*, 70(5):493–503.
- Löbrich, M., Shibata, A., Beucher, A., Fisher, A., Ensminger, M., Goodarzi, A. A., Barton, O., und Jeggo, P. A. (2010). gammaH2AX foci analysis for monitoring DNA double-strand break repair: strengths, limitations and optimization. *Cell Cycle*, 9(4):662–669.
- Lee, J.-H. und Paull, T. T. (2005). ATM activation by DNA double-strand breaks through the Mre11-Rad50-Nbs1 complex. *Science*, 308(5721):551–554.
- Lempiäinen, H. und Halazonetis, T. D. (2009). Emerging common themes in regulation of PIKKs and PI3Ks. *EMBO J*, 28(20):3067–3073.
- Liao, H., Winkfein, R. J., Mack, G., Rattner, J. B., und Yen, T. J. (1995). CENP-F is a protein of the nuclear matrix that assembles onto kinetochores at late G2 and is rapidly degraded after mitosis. *J Cell Biol*, 130(3):507–518.
- Lieber, M. R., Lu, H., Gu, J., und Schwarz, K. (2008). Flexibility in the order of action and in the enzymology of the nuclease, polymerases, and ligase of vertebrate non-homologous DNA end joining: relevance to cancer, aging, and the immune system. *Cell Res*, 18(1):125–133.
- Lin, D. I., Aggarwal, P., und Diehl, J. A. (2008). Phosphorylation of MCM3 on Ser-112 regulates its incorporation into the MCM2-7 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(23):8079–8084.
- Liu, Q., Guntuku, S., Cui, X. S., Matsuoka, S., Cortez, D., Tamai, K., Luo, G., Carattini-Rivera, S., DeMayo, F., Bradley, A., Donehower, L. A., und Elledge, S. J. (2000). Chk1 is an essential kinase that is regulated by Atr and required for the G(2)/M DNA damage checkpoint. *Genes Dev*, 14(12):1448–1459.
- Longhese, M. P., Bonetti, D., Manfrini, N., und Clerici, M. (2010). Mechanisms and regulation of DNA end resection. *EMBO J*, 29(17):2864–2874.



- Lou, Z., Chen, B. P.-C., Asaithamby, A., Minter-Dykhouse, K., Chen, D. J., und Chen, J. (2004). MDC1 regulates DNA-PK autophosphorylation in response to DNA damage. *J Biol Chem*, 279(45):46359–46362.
- Lou, Z., Minter-Dykhouse, K., Franco, S., Gostissa, M., Rivera, M. A., Celeste, A., Manis, J. P., van Deursen, J., Nussenzweig, A., Paull, T. T., Alt, F. W., und Chen, J. (2006). MDC1 maintains genomic stability by participating in the amplification of ATM-dependent DNA damage signals. *Mol Cell*, 21(2):187–200.
- Lovejoy, C. A. und Cortez, D. (2009). Common mechanisms of PIKK regulation. *DNA Repair (Amst)*, 8(9):1004–1008.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., und Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*, 193(1):265–275.
- Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K., Sargent, D. F., und Richmond, T. J. (1997). Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, 389(6648):251–260.
- Lukas, C., Falck, J., Bartkova, J., Bartek, J., und Lukas, J. (2003). Distinct spatiotemporal dynamics of mammalian checkpoint regulators induced by DNA damage. *Nat Cell Biol*, 5(3):255–260.
- Lukas, J., Lukas, C., und Bartek, J. (2011). More than just a focus: The chromatin response to DNA damage and its role in genome integrity maintenance. *Nat Cell Biol*, 13(10):1161–1169.
- Ma, Y., Pannicke, U., Schwarz, K., und Lieber, M. R. (2002). Hairpin opening and overhang processing by an Artemis/DNA-dependent protein kinase complex in nonhomologous end joining and V(D)J recombination. *Cell*, 108(6):781–794.
- Maalouf, M., Durante, M., und Foray, N. (2011). Biological effects of space radiation on human cells: history, advances and outcomes. *J Radiat Res (Tokyo)*, 52(2):126–146.
- MacDougall, C. A., Byun, T. S., Van, C., ching Yee, M., und Cimprich, K. A. (2007). The structural determinants of checkpoint activation. *Genes Dev*, 21(8):898–903.
- Macurek, L., Lindqvist, A., Voets, O., Kool, J., Vos, H. R., und Medema, R. H. (2010). Wip1 phosphatase is associated with chromatin and dephosphorylates gammaH2AX to promote checkpoint inhibition. *Oncogene*, 29(15):2281–2291.
- Mailand, N., Bekker-Jensen, S., Fastrup, H., Melander, F., Bartek, J., Lukas, C., und Lukas, J. (2007). RNF8 ubiquitylates histones at DNA double-strand breaks and promotes assembly of repair proteins. *Cell*, 131(5):887–900.
- Mannironi, C., Bonner, W. M., und Hatch, C. L. (1989). H2A.X, a histone isoprotein with a conserved C-terminal sequence, is encoded by a novel mRNA with both DNA replication type and polyA 3' processing signals. *Nucleic Acids Res*, 17(22):9113–9126.
- Mari, P.-O., Florea, B. I., Persengiev, S. P., Verkaik, N. S., Brüggewirth, H. T., Modesti, M., Giglia-Mari, G., Bezstarosti, K., Demmers, J. A. A., Luider, T. M., Houtsmuller, A. B., und van Gent, D. C. (2006). Dynamic assembly of end-joining complexes requires interaction between Ku70/80 and XRCC4. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(49):18597–18602.
- Marti, T. M., Hefner, E., Feeney, L., Natale, V., und Cleaver, J. E. (2006). H2AX phosphorylation within the G1 phase after UV irradiation depends on nucleotide excision repair and not DNA double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(26):9891–9896.
- Martin, S. J., Reutelingsperger, C. P., McGahon, A. J., Rader, J. A., van Schie, R. C., LaFace, D. M., und Green, D. R. (1995). Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of Bcl-2 and Abl. *J Exp Med*, 182(5):1545–1556.
- Matsumoto, Y. und Kim, K. (1995). Excision of deoxyribose phosphate residues by DNA polymerase beta during DNA repair. *Science*, 269(5224):699–702.
- Matsuoka, S., Ballif, B. A., Smogorzewska, A., McDonald, E. R., Hurov, K. E., Luo, J., Bakalarski, C. E., Zhao, Z., Solimini, N., Lerenthal, Y., Shiloh, Y., Gygi, S. P., und Elledge, S. J. (2007). ATM and ATR substrate analysis reveals extensive protein networks responsive to DNA damage. *Science*, 316(5828):1160–1166.

- McBlane, J. F., van Gent, D. C., Ramsden, D. A., Romeo, C., Cuomo, C. A., Gellert, M., und Oettinger, M. A. (1995). Cleavage at a V(D)J recombination signal requires only RAG1 and RAG2 proteins and occurs in two steps. *Cell*, 83(3):387–395.
- McBryant, S. J., Adams, V. H., und Hansen, J. C. (2006). Chromatin architectural proteins. *Chromosome Res*, 14(1):39–51.
- McManus, K. J. und Hendzel, M. J. (2005). ATM-dependent DNA damage-independent mitotic phosphorylation of H2AX in normally growing mammalian cells. *Mol Biol Cell*, 16(10):5013–5025.
- Meek, K., Dang, V., und Lees-Miller, S. P. (2008). DNA-PK: the means to justify the ends? *Adv Immunol*, 99:33–58.
- Merkle, D., Douglas, P., Moorhead, G. B. G., Leonenko, Z., Yu, Y., Cramb, D., Bazett-Jones, D. P., und Lees-Miller, S. P. (2002). The DNA-dependent protein kinase interacts with DNA to form a protein-DNA complex that is disrupted by phosphorylation. *Biochemistry*, 41(42):12706–12714.
- Meyer, B., Voss, K., Herrlitz, M., Merk, B., Durante, M., und Taucher-Scholz, G. (2010). Evaluation of a nuclear-wide gammaH2AX response after ion irradiation. *GSI Scientific Report 2009 - Radiation-Biophysics*.
- Mimitou, E. P. und Symington, L. S. (2009). Nucleases and helicases take center stage in homologous recombination. *Trends Biochem Sci*, 34(5):264–272.
- Mimitou, E. P. und Symington, L. S. (2010). Ku prevents Exo1 and Sgs1-dependent resection of DNA ends in the absence of a functional MRX complex or Sae2. *EMBO J*, 29(19):3358–3369.
- Mimitou, E. P. und Symington, L. S. (2011). DNA end resection—unraveling the tail. *DNA Repair (Amst)*, 10(3):344–348.
- Misteli, T. und Soutoglou, E. (2009). The emerging role of nuclear architecture in DNA repair and genome maintenance. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10(4):243–254.
- Mukherjee, B., Kessinger, C., Kobayashi, J., Chen, B. P. C., Chen, D. J., Chatterjee, A., und Burma, S. (2006). DNA-PK phosphorylates histone H2AX during apoptotic DNA fragmentation in mammalian cells. *DNA Repair (Amst)*, 5(5):575–590.
- Muramatsu, M., Kinoshita, K., Fagarasan, S., Yamada, S., Shinkai, Y., und Honjo, T. (2000). Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*, 102(5):553–563.
- Murken, J., Grimm, T., und Holinski-Feder, E. (2006). *Humangenetik*. Thieme.
- Neal, J. A., Dang, V., Douglas, P., Wold, M. S., Lees-Miller, S. P., und Meek, K. (2011). Inhibition of homologous recombination by DNA-dependent protein kinase requires kinase activity, is titratable, and is modulated by autophosphorylation. *Mol Cell Biol*, 31(8):1719–1733.
- Neal, J. A. und Meek, K. (2011). Choosing the right path: does DNA-PK help make the decision? *Mutat Res*, 711(1-2):73–86.
- O'Driscoll, M., Ruiz-Perez, V. L., Woods, C. G., Jeggo, P. A., und Goodship, J. A. (2003). A splicing mutation affecting expression of ataxia-telangiectasia and Rad3-related protein (ATR) results in Seckel syndrome. *Nat Genet*, 33(4):497–501.
- Park, E.-J., Chan, D. W., Park, J.-H., Oettinger, M. A., und Kwon, J. (2003). DNA-PK is activated by nucleosomes and phosphorylates H2AX within the nucleosomes in an acetylation-dependent manner. *Nucleic Acids Res*, 31(23):6819–6827.
- Pellegrini, L., Yu, D. S., Lo, T., Anand, S., Lee, M., Blundell, T. L., und Venkitaraman, A. R. (2002). Insights into DNA recombination from the structure of a RAD51-BRCA2 complex. *Nature*, 420(6913):287–293.
- Peng, Y., Woods, R. G., Beamish, H., Ye, R., Lees-Miller, S. P., Lavin, M. F., und Bedford, J. S. (2005). Deficiency in the catalytic subunit of DNA-dependent protein kinase causes down-regulation of ATM. *Cancer Res*, 65(5):1670–1677.

- Petersen, S., Casellas, R., Reina-San-Martin, B., Chen, H. T., Difilippantonio, M. J., Wilson, P. C., Hanitsch, L., Celeste, A., Muramatsu, M., Pilch, D. R., Redon, C., Ried, T., Bonner, W. M., Honjo, T., Nussenzweig, M. C., und Nussenzweig, A. (2001). AID is required to initiate Nbs1/gamma-H2AX focus formation and mutations at sites of class switching. *Nature*, 414(6864):660–665.
- Pichierri, P., Rosselli, F., und Franchitto, A. (2003). Werner's syndrome protein is phosphorylated in an ATR/ATM-dependent manner following replication arrest and DNA damage induced during the S phase of the cell cycle. *Oncogene*, 22(10):1491–1500.
- Pilch, D. R., Sedelnikova, O. A., Redon, C., Celeste, A., Nussenzweig, A., und Bonner, W. M. (2003). Characteristics of gamma-H2AX foci at DNA double-strand breaks sites. *Biochem Cell Biol*, 81(3):123–129.
- Poehlmann, A. und Roessner, A. (2010). Importance of DNA damage checkpoints in the pathogenesis of human cancers. *Pathol Res Pract*, 206(9):591–601.
- Pospelova, T. V., Demidenko, Z. N., Bukreeva, E. I., Pospelov, V. A., Gudkov, A. V., und Blagosklonny, M. V. (2009). Pseudo-DNA damage response in senescent cells. *Cell Cycle*, 8(24):4112–4118.
- Prasad, R., Beard, W. A., Strauss, P. R., und Wilson, S. H. (1998). Human DNA polymerase beta deoxyribose phosphate lyase. Substrate specificity and catalytic mechanism. *J Biol Chem*, 273(24):15263–15270.
- Psonka-Antonczyk, K., Elsässer, T., Gudowska-Nowak, E., und Taucher-Scholz, G. (2009). Distribution of double-strand breaks induced by ionizing radiation at the level of single DNA molecules examined by atomic force microscopy. *Radiat Res*, 172(3):288–295.
- Quanz, M., Berthault, N., Roulin, C., Roy, M., Herbette, A., Agrario, C., Alberti, C., Josserand, V., Coll, J.-L., Sastre-Garau, X., Cosset, J.-M., Larue, L., Sun, J.-S., und Dutreix, M. (2009a). Small-molecule drugs mimicking DNA damage: a new strategy for sensitizing tumors to radiotherapy. *Clin Cancer Res*, 15(4):1308–1316.
- Quanz, M., Chassoux, D., Berthault, N., Agrario, C., Sun, J.-S., und Dutreix, M. (2009b). Hyperactivation of DNA-PK by double-strand break mimicking molecules disorganizes DNA damage response. *PLoS One*, 4(7):e6298.
- Quennet, V., Beucher, A., Barton, O., Takeda, S., und Löbrich, M. (2011). CtIP and MRN promote non-homologous end-joining of etoposide-induced DNA double-strand breaks in G1. *Nucleic Acids Res*, 39(6):2144–2152.
- Rada, C., Williams, G. T., Nilsen, H., Barnes, D. E., Lindahl, T., und Neuberger, M. S. (2002). Immunoglobulin isotype switching is inhibited and somatic hypermutation perturbed in UNG-deficient mice. *Curr Biol*, 12(20):1748–1755.
- Radulescu, I., Elmroth, K., und Stenerlöv, B. (2004). Chromatin organization contributes to non-randomly distributed double-strand breaks after exposure to high-LET radiation. *Radiat Res*, 161(1):1–8.
- Rattner, J. B., Rao, A., Fritzler, M. J., Valencia, D. W., und Yen, T. J. (1993). CENP-F is a .ca 400 kDa kinetochore protein that exhibits a cell-cycle dependent localization. *Cell Motil Cytoskeleton*, 26(3):214–226.
- Revet, I., Feeney, L., Bruguera, S., Wilson, W., Dong, T. K., Oh, D. H., Dankort, D., und Cleaver, J. E. (2011). Functional relevance of the histone gammaH2Ax in the response to DNA damaging agents. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(21):8663–8667.
- Revy, P., Muto, T., Levy, Y., Geissmann, F., Plebani, A., Sanal, O., Catalan, N., Forveille, M., Dufourcq-Labeledouse, R., Gennery, A., Tezcan, I., Ersoy, F., Kayserili, H., Ugazio, A. G., Brousse, N., Muramatsu, M., Notarangelo, L. D., Kinoshita, K., Honjo, T., Fischer, A., und Durandy, A. (2000). Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the Hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*, 102(5):565–575.
- Riballo, E., Kühne, M., Rief, N., Doherty, A., Smith, G. C. M., Recio, M.-J., Reis, C., Dahm, K., Fricke, A., Krempler, A., Parker, A. R., Jackson, S. P., Gennery, A., Jeggo, P. A., und Löbrich, M. (2004). A pathway of double-strand break rejoining dependent upon ATM, Artemis, and proteins locating to gamma-H2AX foci. *Mol Cell*, 16(5):715–724.

- Rivera-Munoz, P., Malivert, L., Derdouch, S., Azerrad, C., Abramowski, V., Revy, P., und de Villartay, J.-P. (2007). DNA repair and the immune system: From V(D)J recombination to aging lymphocytes. *Eur J Immunol*, 37 Suppl 1:S71–S82.
- Rogakou, E. P., Boon, C., Redon, C., und Bonner, W. M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J Cell Biol*, 146(5):905–916.
- Rogakou, E. P., Nieves-Neira, W., Boon, C., Pommier, Y., und Bonner, W. M. (2000). Initiation of DNA fragmentation during apoptosis induces phosphorylation of H2AX histone at serine 139. *J Biol Chem*, 275(13):9390–9395.
- Rogakou, E. P., Pilch, D. R., Orr, A. H., Ivanova, V. S., und Bonner, W. M. (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J Biol Chem*, 273(10):5858–5868.
- Rothkamm, K. und Horn, S. (2009). gamma-H2AX as protein biomarker for radiation exposure. *Ann Ist Super Sanita*, 45(3):265–271.
- Rothkamm, K. und Löbrich, M. (2003). Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(9):5057–5062.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., und Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sarkaria, J. N., Busby, E. C., Tibbetts, R. S., Roos, P., Taya, Y., Karnitz, L. M., und Abraham, R. T. (1999). Inhibition of ATM and ATR kinase activities by the radiosensitizing agent, caffeine. *Cancer Res*, 59(17):4375–4382.
- Sartori, A. A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., und Jackson, S. P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature*, 450(7169):509–514.
- Satokata, I., Tanaka, K., Miura, N., Narita, M., Mimaki, T., Satoh, Y., Kondo, S., und Okada, Y. (1992). Three nonsense mutations responsible for group A xeroderma pigmentosum. *Mutat Res*, 273(2):193–202.
- Savic, V., Yin, B., Maas, N. L., Bredemeyer, A. L., Carpenter, A. C., Helmink, B. A., Yang-lott, K. S., Sleckman, B. P., und Bassing, C. H. (2009). Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Mol Cell*, 34(3):298–310.
- Savitsky, K., Bar-Shira, A., Gilad, S., Rotman, G., Ziv, Y., Vanagaite, L., Tagle, D. A., Smith, S., Uziel, T., Sfez, S., Ashkenazi, M., Pecker, I., Frydman, M., Harnik, R., Patanjali, S. R., Simmons, A., Clines, G. A., Sartiel, A., Gatti, R. A., Chessa, L., Sanal, O., Lavin, M. F., Jaspers, N. G., Taylor, A. M., Arlett, C. F., Miki, T., Weissman, S. M., Lovett, M., Collins, F. S., und Shiloh, Y. (1995). A single ataxia telangiectasia gene with a product similar to PI-3 kinase. *Science*, 268(5218):1749–1753.
- Scholz, M. (2003). *Radiation Effects on Polymers for Biological Use*, Kap. Effects of Ion Radiation on Cells and Tissues, S. 95 – 155. Springer.
- Scholz, M., Kellerer, A. M., Kraft-Weyrather, W., und Kraft, G. (1997). Computation of cell survival in heavy ion beams for therapy. The model and its approximation. *Radiat Environ Biophys*, 36(1):59–66.
- Schwartz, R. A., Carson, C. T., Schuberth, C., und Weitzman, M. D. (2009). Adeno-associated virus replication induces a DNA damage response coordinated by DNA-dependent protein kinase. *J Virol*, 83(12):6269–6278.
- Sharan, S. K., Morimatsu, M., Albrecht, U., Lim, D. S., Regel, E., Dinh, C., Sands, A., Eichele, G., Hasty, P., und Bradley, A. (1997). Embryonic lethality and radiation hypersensitivity mediated by Rad51 in mice lacking Brca2. *Nature*, 386(6627):804–810.
- Shibata, A., Conrad, S., Birraux, J., Geuting, V., Barton, O., Ismail, A., Kakarougkas, A., Meek, K., Taucher-Scholz, G., Löbrich, M., und Jeggo, P. A. (2011). Factors determining DNA double-strand break repair pathway choice in G2 phase. *EMBO J*, 30(6):1079–1092.
- Shiotani, B. und Zou, L. (2009). Single-stranded DNA orchestrates an ATM-to-ATR switch at DNA breaks. *Mol Cell*, 33(5):547–558.

- Shrivastav, M., Miller, C. A., Haro, L. P. D., Durant, S. T., Chen, B. P. C., Chen, D. J., und Nickoloff, J. A. (2009). DNA-PKcs and ATM co-regulate DNA double-strand break repair. *DNA Repair (Amst)*, 8(8):920–929.
- Solier, S. und Pommier, Y. (2009). The apoptotic ring: a novel entity with phosphorylated histones H2AX and H2B and activated DNA damage response kinases. *Cell Cycle*, 8(12):1853–1859.
- Solier, S., Sordet, O., Kohn, K. W., und Pommier, Y. (2009). Death receptor-induced activation of the Chk2- and histone H2AX-associated DNA damage response pathways. *Mol Cell Biol*, 29(1):68–82.
- Soutoglou, E. und Misteli, T. (2008). Activation of the cellular DNA damage response in the absence of DNA lesions. *Science*, 320(5882):1507–1510.
- Stankovic, T., Kidd, A. M., Sutcliffe, A., McGuire, G. M., Robinson, P., Weber, P., Bedenham, T., Bradwell, A. R., Easton, D. F., Lennox, G. G., Haites, N., Byrd, P. J., und Taylor, A. M. (1998). ATM mutations and phenotypes in ataxia-telangiectasia families in the British Isles: expression of mutant ATM and the risk of leukemia, lymphoma, and breast cancer. *Am J Hum Genet*, 62(2):334–345.
- Stenerl w, B., Carlsson, J., Blomquist, E., und Erixon, K. (1994). Clonogenic cell survival and rejoining of DNA double-strand breaks: comparisons between three cell lines after photon or He ion irradiation. *Int J Radiat Biol*, 65(6):631–639.
- Stewart, G. S., Panier, S., Townsend, K., Al-Hakim, A. K., Kolas, N. K., Miller, E. S., Nakada, S., Ylanko, J., Olivarius, S., Mendez, M., Oldreive, C., Wildenhain, J., Tagliaferro, A., Pelletier, L., Taubenheim, N., Durandy, A., Byrd, P. J., Stankovic, T., Taylor, A. M. R., und Durocher, D. (2009). The RIDDLE syndrome protein mediates a ubiquitin-dependent signaling cascade at sites of DNA damage. *Cell*, 136(3):420–434.
- Stewart, G. S., Wang, B., Bignell, C. R., Taylor, A. M. R., und Elledge, S. J. (2003). MDC1 is a mediator of the mammalian DNA damage checkpoint. *Nature*, 421(6926):961–966.
- Stiff, T., O'Driscoll, M., Rief, N., Iwabuchi, K., Löbrich, M., und Jeggo, P. A. (2004). ATM and DNA-PK function redundantly to phosphorylate H2AX after exposure to ionizing radiation. *Cancer Res*, 64(7):2390–2396.
- Stucki, M., Clapperton, J. A., Mohammad, D., Yaffe, M. B., Smerdon, S. J., und Jackson, S. P. (2005). MDC1 directly binds phosphorylated histone H2AX to regulate cellular responses to DNA double-strand breaks. *Cell*, 123(7):1213–1226.
- Stucki, M. und Jackson, S. P. (2006). gammaH2AX and MDC1: anchoring the DNA-damage-response machinery to broken chromosomes. *DNA Repair (Amst)*, 5(5):534–543.
- Suciu, D. (1983). Cellular death by apoptosis in some radiosensitive and radioresistant mammalian tissues. *J Theor Biol*, 105(3):391–401.
- Sun, Y., Jiang, X., Chen, S., und Price, B. D. (2006). Inhibition of histone acetyltransferase activity by anacardic acid sensitizes tumor cells to ionizing radiation. *FEBS Lett*, 580(18):4353–4356.
- Sun, Y., Xu, Y., Roy, K., und Price, B. D. (2007). DNA damage-induced acetylation of lysine 3016 of ATM activates ATM kinase activity. *Mol Cell Biol*, 27(24):8502–8509.
- Symington, L. S. und Gautier, J. (2011). Double-strand break end resection and repair pathway choice. *Annu Rev Genet*, 45:247–271.
- Taucher-Scholz, G., Heilmann, J., und Kraft, G. (1996). Induction and rejoining of DNA double-strand breaks in CHO cells after heavy ion irradiation. *Adv Space Res*, 18(1-2):83–92.
- Tauchi, H., Kobayashi, J., ichi Morishima, K., van Gent, D. C., Shiraishi, T., Verkaik, N. S., vanHeems, D., Ito, E., Nakamura, A., Sonoda, E., Takata, M., Takeda, S., Matsuura, S., und Komatsu, K. (2002). Nbs1 is essential for DNA repair by homologous recombination in higher vertebrate cells. *Nature*, 420(6911):93–98.
- Taylor, W. R. und Stark, G. R. (2001). Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene*, 20(15):1803–1815.
- Tibbetts, R. S., Cortez, D., Brumbaugh, K. M., Scully, R., Livingston, D., Elledge, S. J., und Abraham, R. T. (2000). Functional interactions between BRCA1 and the checkpoint kinase ATR during genotoxic stress. *Genes Dev*, 14(23):2989–3002.

- Tobias, F. (2011). Analyse von schnellen dynamischen Prozessen und Proteininteraktionen nach dicht ionisierender Bestrahlung. Vorgelegte Dissertation, Technische Universität Darmstadt.
- Tomimatsu, N., Tahimic, C. G. T., Otsuki, A., Burma, S., Fukuhara, A., Sato, K., Shiota, G., Oshimura, M., Chen, D. J., und Kurimasa, A. (2007). Ku70/80 modulates ATM and ATR signaling pathways in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem*, 282(14):10138–10145.
- Toouli, C. D., Huschtscha, L. I., Neumann, A. A., Noble, J. R., Colgin, L. M., Hukku, B., und Reddel, R. R. (2002). Comparison of human mammary epithelial cells immortalized by simian virus 40 T-Antigen or by the telomerase catalytic subunit. *Oncogene*, 21(1):128–139.
- Uematsu, N., Weterings, E., ichi Yano, K., Morotomi-Yano, K., Jakob, B., Taucher-Scholz, G., Mari, P.-O., van Gent, D. C., Chen, B. P. C., und Chen, D. J. (2007). Autophosphorylation of DNA-PKCS regulates its dynamics at DNA double-strand breaks. *J Cell Biol*, 177(2):219–229.
- van der Burg, M., van Dongen, J. J. M., und van Gent, D. C. (2009). DNA-PKcs deficiency in human: long predicted, finally found. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 9(6):503–509.
- Vavrova, J. und Rezacova, M. (2011). The importance of senescence in ionizing radiation-induced tumour suppression. *Folia Biol (Praha)*, 57(2):41–46.
- Voss, K., Merk, B., Fischer, B., Jakob, B., Tobias, F., und Taucher-Scholz, G. (2011). First Sub-Micron Targeting with Single Ions. *GSI Scientific Report - Radiation-Biophysics*.
- Ward, I. M. und Chen, J. (2001). Histone H2AX is phosphorylated in an ATR-dependent manner in response to replicational stress. *J Biol Chem*, 276(51):47759–47762.
- Ward, J. F. (1975). Radiation-induced strand breakage in DNA. *Basic Life Sci*, 5B:471–472.
- Ward, J. F. (1988). DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 35:95–125.
- Ward, J. F. (1994). The complexity of DNA damage: relevance to biological consequences. *Int J Radiat Biol*, 66(5):427–432.
- Williams, G. J., Lees-Miller, S. P., und Tainer, J. A. (2010). Mre11-Rad50-Nbs1 conformations and the control of sensing, signaling, and effector responses at DNA double-strand breaks. *DNA Repair (Amst)*, 9(12):1299–1306.
- Wright, J. A., Keegan, K. S., Herendeen, D. R., Bentley, N. J., Carr, A. M., Hoekstra, M. F., und Concannon, P. (1998). Protein kinase mutants of human ATR increase sensitivity to UV and ionizing radiation and abrogate cell cycle checkpoint control. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(13):7445–7450.
- Wu, C., Bassett, A., und Travers, A. (2007a). A variable topology for the 30-nm chromatin fibre. *EMBO Rep*, 8(12):1129–1134.
- Wu, X., Shell, S. M., Liu, Y., und Zou, Y. (2007b). ATR-dependent checkpoint modulates XPA nuclear import in response to UV irradiation. *Oncogene*, 26(5):757–764.
- Xiao, A., Li, H., Shechter, D., Ahn, S. H., Fabrizio, L. A., Erdjument-Bromage, H., Ishibe-Murakami, S., Wang, B., Tempst, P., Hofmann, K., Patel, D. J., Elledge, S. J., und Allis, C. D. (2009). WSTF regulates the H2A.X DNA damage response via a novel tyrosine kinase activity. *Nature*, 457(7225):57–62.
- Xu, Y. und Price, B. D. (2011). Chromatin dynamics and the repair of DNA double strand breaks. *Cell Cycle*, 10(2):261–267.
- Yajima, H., Lee, K.-J., Zhang, S., Kobayashi, J., und Chen, B. P. C. (2009). DNA double-strand break formation upon UV-induced replication stress activates ATM and DNA-PKcs kinases. *J Mol Biol*, 385(3):800–810.
- Yata, K. und Esashi, F. (2009). Dual role of CDKs in DNA repair: to be, or not to be. *DNA Repair (Amst)*, 8(1):6–18.
- Yoshida, M., Kijima, M., Akita, M., und Beppu, T. (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem*, 265(28):17174–17179.

- You, Z. und Bailis, J. M. (2010). DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends Cell Biol*, 20(7):402–409.
- You, Z., Shi, L. Z., Zhu, Q., Wu, P., Zhang, Y.-W., Basilio, A., Tonnu, N., Verma, I. M., Berns, M. W., und Hunter, T. (2009). CtIP links DNA double-strand break sensing to resection. *Mol Cell*, 36(6):954–969.
- Yu, X. und Baer, R. (2000). Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor. *J Biol Chem*, 275(24):18541–18549.
- Yuan, J. und Chen, J. (2010). MRE11-RAD50-NBS1 complex dictates DNA repair independent of H2AX. *J Biol Chem*, 285(2):1097–1104.
- Yun, M. H. und Hiom, K. (2009). CtIP-BRCA1 modulates the choice of DNA double-strand-break repair pathway throughout the cell cycle. *Nature*, 459(7245):460–463.
- Ziv, Y., Bielopolski, D., Galanty, Y., Lukas, C., Taya, Y., Schultz, D. C., Lukas, J., Bekker-Jensen, S., Bartek, J., und Shiloh, Y. (2006). Chromatin relaxation in response to DNA double-strand breaks is modulated by a novel ATM- and KAP-1 dependent pathway. *Nat Cell Biol*, 8(8):870–876.
- Zou, L. und Elledge, S. J. (2003). Sensing DNA damage through ATRIP recognition of RPA-ssDNA complexes. *Science*, 300(5625):1542–1548.

## 7 Anhang

### 7.1 Veröffentlichungen und Tagungsbeiträge

#### Veröffentlichungen

B. Meyer, KO. Voss, M. Herrlitz, B. Merk, M. Durante und G. Taucher-Scholz (2010). Evaluation of a nuclear-wide  $\gamma$ H2AX response after ion irradiation. GSI Scientific Report 2009 S.465

B. Meyer, KO. Voss, B. Jakob, M. Herrlitz, G. Becker, M. Durante und G. Taucher-Scholz (2011). Characterization of the nuclear-wide  $\gamma$ H2AX response after ion irradiation. GSI Scientific Report 2010 S.440

#### Tagungsbeiträge

B. Meyer, N. Auerbeck, K. Knoop und G. Taucher-Scholz  
„Effects of histone acetyl transferase Tip60 recruitment to complex DNA lesions.“  
Posterpräsentation, Women in Radiation Sciences - A Century after Marie Curie, 2009, München

B. Meyer, N. Auerbeck, K. Knoop, F. Tobias, B. Jakob, M. Durante und G. Taucher-Scholz  
„Effects of histone acetyl transferase Tip60 recruitment to complex DNA lesions.“  
Vortrag, Heavy Ions in Therapy and Space Symposium, 2009, Köln

B. Meyer, N. Auerbeck, F. Tobias, B. Jakob, M. Durante und G. Taucher-Scholz  
„Modification of chromatin in connection with the induction and repair of ion-induced DNA lesions.“  
Vortrag, 12. GBS-Jahrestagung, 2009, Essen

B. Meyer, KO. Voss, B. Merk, M. Herrlitz, N. Auerbeck, M. Durante und G. Taucher-Scholz  
„Evaluation of the nuclear-wide H2AX phosphorylation after defined irradiation with heavy ions.“  
Posterpräsentation, 9th International Microbeam Workshop, 2010, Darmstadt

B. Meyer, KO. Voss, M. Herrlitz, B. Merk, N. Auerbeck, F. Tobias, B. Jakob, M. Durante und G. Taucher-Scholz.  
„Charakterisierung des pan-nukleären  $\gamma$ H2AX-Signals nach Schwerionenbestrahlung.“  
Vortrag, 13. GBS-Jahrestagung, 2010, Hamburg

B. Meyer, KO. Voss, M. Herrlitz, N. Auerbeck, F. Tobias, B. Jakob, M. Durante und G. Taucher-Scholz  
„Modification of chromatin after the induction of complex DNA lesions.“  
Posterpräsentation, 11th Biennial DGDR Meeting, 2010, Jena

B. Meyer, KO. Voss, N. Auerbeck, M. Herrlitz, B. Jakob, M. Durante und G. Taucher-Scholz  
„Induction of nuclear-wide H2AX phosphorylation by ion irradiation.“  
Posterpräsentation, 14th International Congress of Radiation Research, 2011, Warschau



## 7.2 Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name	Barbara Meyer
Geburtsdatum	19.01.1983
Geburtsort	Nürnberg

### Universitäre Ausbildung

Seit 11/2008	Promotion an der Technischen Universität Darmstadt, Fachbereich Biologie, durchgeführt am GSI Helmholtzzentrum für Schwerionenforschung in der Abteilung Biophysik
2008	Abschluss des Biologiestudiums, Diplom
2007 - 2008	Diplomarbeit am Humangenetischen Institut am Universitätsklinikum der Universität Erlangen-Nürnberg
2003 - 2008	Studium der Biologie an der Universität Erlangen-Nürnberg
2002	Studium der Pharmazie an der Universität Erlangen-Nürnberg

### Schulbildung

2002	Allgemeine Hochschulreife
1993 - 2002	Labenwolf Gymnasium Nürnberg

### Auszeichnungen

Reisestipendium zur Tagung Women in Radiation Sciences - A Century after Marie Curie, 2009, München, vergeben vom Helmholtzzentrum München

Reisestipendium zur Tagung Heavy Ions in Therapy and Space Symposium, 2009, Köln, vergeben von der Universities Space Research Association, Houston, Texas

Scholars-in-Training Reisestipendium zur Tagung 14th International Congress of Radiation Research, 2011, Warschau, vergeben von der Radiation Research Society

### 7.3 Danksagung

Ich möchte mich bei Herrn Prof. Dr. Marco Durante bedanken für die Möglichkeit, meine Arbeit in der Abteilung Biophysik des GSI durchführen zu können und die Unterstützung meiner Arbeit.

Bei Herrn Prof. Dr. Markus Löbrich bedanke ich mich für die Übernahme des 2. Gutachtens und für die Diskussionsbereitschaft während der Präsentationen, sowie das Überlassen von biologischen Materialien.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Frau Dr. Gisela Taucher-Scholz für die hervorragende Betreuung, die fortwährende Unterstützung, ihr großes Engagement und nicht zuletzt für die herzliche Zusammenarbeit.

Bei Dr. Kay-Obbe Voss bedanke ich mich für die Unterstützung bei der Quantifizierung der kernweiten Immunfluoreszenzsignale. Danke auch an ihn und Bruno Merk für ihre unermüdliche Hilfe bei den Bestrahlungsmarathons an der Mikrosonde.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Gudrun Becker, Anna Lena Leifke, Dr. Burkhard Jakob, Maren Herrlitz und Bettina Kass sowie bei allen weiteren Mitgliedern und ehemaligen Mitgliedern unserer Arbeitsgruppe bedanken für die technische Hilfe im Labor, die freundschaftliche Zusammenarbeit und angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich bedanke mich bei Rayees Khan, Wolfgang Becher und Günter Lenz für die Hilfe bei der UNILAC-Bestrahlung, sowie bei allen weiteren Mitgliedern der Biophysik des GSI, die mir bei der Erstellung meiner Arbeit geholfen haben. An dieser Stelle auch ein herzliches Dankeschön an Anke Schott und Dr. Iris Müller.

Schließlich möchte ich mich für die Finanzierung durch das Bundesministerium für Bildung und Forschung (02NUK001A) bedanken.

Mein großer Dank gilt außerdem meiner Familie, meinen Freunden und meinem Freund, die mir stets Rückhalt gegeben haben und auf die ich mich jederzeit verlassen konnte.

## 7.4 Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre hiermit ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Sämtliche aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommene Gedanken sind als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt und noch nicht veröffentlicht.

Darmstadt, den 21. Dezember 2011

.....